

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE  
*Lupinus mutabilis* ("tarwi") MEDIANTE PROTEASAS  
DE *Bacillus sp.*”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

**AUTOR**

**Jackelyn Elena Borja Lozano**

**Lima – Perú**

**2014**

**El presente trabajo de tesis está dedicado a:**

**A mis amados padres**, Elena y Francisco, quienes con su amor y sacrificio supieron apoyarme. Por ello, mis logros son también suyos; mis esfuerzos y metas son inspirados en ustedes.

**A mis queridos hermanos**, en especial a Jenny, por brindarme la mejor herencia de esta vida, una carrera profesional, basada en principios y valores.

**A mi compañero y amigo**, Marco, por su constante apoyo y comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora, Dra. Amparo Zavaleta, por su amistad, confianza y apoyo depositado en mi persona en todo momento.

Al equipo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular (en especial a Robert, Guadalupe, Salomón, NathalyBoris), por todo el apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis.

A Arturo Paredes, por su amistad, ayuda científica y entusiasmo en etapas muy importantes de la tesis.

A mis familiares, y verdaderos amigos, por confiar en mí, motivarme y asistirme en momentos difíciles.

A mis jurados examinador y calificador, por el apoyo brindado con la revisión oportuna de la tesis.

**Este trabajo de investigación fue financiado parcialmente con el apoyo del Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI 2013.**

## INDICE DE TABLAS

	Páginas
<b>Tabla 1.</b> Proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio.	27
<b>Tabla 2.</b> Lista de las principales legumbres comestibles y su producción.	33
<b>Tabla 3.</b> Contenido de proteínas de los principales cereales, legumbres, semillas oleaginosas y fuentes vegetales.	34
<b>Tabla 4.</b> Composición de aminoácidos de proteínas vegetales de diferentes semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas.	35
<b>Tabla 5.</b> Distribución aproximada de las diferentes clases de proteínas en las leguminosas de acuerdo a la clasificación de Osborne.	38
<b>Tabla 6.</b> Tipos de proteínas de almacenamiento predominantes en las semillas de leguminosas.	41
<b>Tabla 7.</b> Clasificación taxonómica del tarwi.	45
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de la composición química del tarwi, soya y frijol.	47
<b>Tabla 9.</b> Porcentajes de proteína en varias especies de <i>Lupinus</i> .	48
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de ácidos grasos de <i>Lupinus mutabilis</i> (% de ácidos grasos totales).	49
<b>Tabla 11.</b> Contenido de aminoácidos en <i>Lupinus mutabilis</i> .	50
<b>Tabla 12.</b> Contenido de minerales en el grano de <i>Lupinus mutabilis</i> .	52
<b>Tabla 13.</b> Composición proximal de la harina de tarwi.	71
<b>Tabla 14.</b> Hidrolizados proteicos obtenidos de tarwi por efecto de las proteasas	74
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de inhibición de Trolox mediante la reacción con DPPH.	77

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibición de hidrolizados proteicos de tarwi mediante la reacción con DPPH. 78

**Tabla 17.** Porcentaje de inhibición de hidrolizados proteicos de tarwi con crudo enzimático mediante la reacción con DPPH. 81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Esquema de las posibles diferencias entre los péptidos liberados de proteínas precursoras por fermentación y / o la digestión gastrointestinal.	11
<b>Figura 2.</b> Sistemas renina - angiotensina y quinina - calicreína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).	13
<b>Figura 3.</b> Daño a las moléculas biológicas por especies reactivas de oxígeno que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.	15
<b>Figura 4.</b> Acción hipocolesterolemizante de péptidos de unión al ácido biliar.	18
<b>Figura 5.</b> Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas por serinproteasas. (A) Ataque nucleofílico, (B) Complejo acil – enzima. (C) Ruptura del complejo.	29
<b>Figura 6.</b> A) Niveles de ramificación y floración del lupino blanco. B) Partes de la semilla de lupino.	46
<b>Figura 7:</b> Diagrama de flujo de deslupinizado del tarwi.	55
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo de la obtención de harina de tarwi.	58
<b>Figura 9.</b> Diagrama de flujo para la obtención del aislado proteico de tarwi.	60
<b>Figura 10.</b> Separación de las proteínas de tarwi por PAGE desnaturizante. Línea (concentración en µg). 1, 8,2; 2, 16,3; 3, 24,5; 4, 32,6.	72
<b>Figura 11.</b> Halo de hidrólisis de la cepa TJF41, <i>Bacillus sp.</i>	73
<b>Figura 12.</b> Hidrólisis enzimática de las proteínas de tarwi con alcalasa (EA) y crudo enzimático (CE).	75
<b>Figura 13.</b> Electroforesis (SDS- PAGE) de proteína <i>Lupinus mutabilis</i> hidrolizadas con	76

alcalasa a diferentes tiempos de reacción.

**Figura 14.** Curva patrón del Trolox expresado en  $\mu\text{g}$  / mL versus % inhibición. 77

**Figura 15.** Relación de hidrolizados proteicos de tarwi con alcalasa versus % inhibición. 78

**Figura 16.** Relación de hidrolizados proteicos de tarwi con crudo enzimático versus % inhibición. 79

**Figura 17.** Comparación de la capacidad antioxidante mediante la IC50 de los hidrolizados proteicos de tarwi con alcalasa (EA), crudo enzimático (CE) y Trolox. 80



# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
2. 1 Antecedentes de obtención de péptidos bioactivos a partir de leguminosas mediante hidrólisis enzimática	4
2. 2 Péptidos bioactivos	10
2. 2. 1 Actividades biológicas de los péptidos bioactivos	12
2. 2 .1. 1 Actividad antihipertensiva	12
2. 2 .1. 2 Actividad antioxidante	14
2. 2. 1. 3 Actividad hipocolesterolémica	17
2. 2. 1. 4 Actividad opiácea	18
2. 2. 1. 5 Actividad antimicrobiana	19
2. 2. 1. 6 Actividad antitrombótica	20
2. 2. 1. 7 Actividad inmunomoduladora	21
2. 2. 1. 8 Actividad anticancerígena	22
2. 2. 1. 9 Actividad de unión a la calmodulina	22
2. 3 Obtención de péptidos bioactivos a partir de hidrólisis enzimática	23
2. 3. 1. Enzimas proteolíticas	26
2. 3. 1. 1 Proteasas bacterianas	29
2. 4 Prospectiva de los péptidos bioactivos	30

2. 5 Leguminosas	32
2. 5. 1 Proteínas de las semillas de leguminosas	36
2. 5. 2 Componentes anti-nutricionales de las leguminosas (ANCs)	41
2. 6 <i>Lupinus mutabilis</i>	44
2. 6. 1 Descripción botánica	45
2. 6. 2 Composición química y valor nutricional	47
2.6.3 Modos de empleo	52
3 MATERIALES Y MÉTODOS	54
3. 1 MATERIALES	54
3. 2 MÉTODOS	55
3. 2. 1 Obtención de la harina de las semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> .	55
3. 2. 1. 1 Deslupinización	55
3. 2. 1. 2 Secado	56
3. 2. 1. 3 Molienda	56
3. 2. 1. 4 Desgrasado	57
3. 2. 2 Análisis proximal de la harina de <i>Lupinus mutabilis</i> .	59
3. 2. 3 Obtención del aislado proteico a partir de la harina de <i>Lupinus mutabilis</i> .	59
3. 2. 3. 1 Obtención de las proteínas hidrosolubles.	59
3. 2. 3. 2 Cuantificación de proteínas hidrosolubles mediante método Bradford.	61

3. 2. 3. 3 Separación de las proteínas hidrosolubles mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE).	62
3. 2. 4 Identificación de cepas de <i>Bacillus sp</i> con mayor actividad proteolítica.	63
3. 2. 5 Producción de proteasas de <i>Bacillus sp</i> .	63
3. 2. 5. 1 Determinación de la actividad enzimática	64
3. 2. 6 Hidrólisis enzimática de las proteínas hidrosolubles de <i>Lupinus mutabilis</i> .	66
3. 2. 6. 1 Determinación de péptidos solubles mediante método de Lowry.	66
3. 2. 6. 2 Determinación de nitrógeno soluble	67
3. 2. 6. 3 Separación de péptidos mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE).	68
3. 2. 7 Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de las semillas de <i>L. mutabilis</i> .	69
4 RESULTADOS	71
5 DISCUSIÓN	81
6 CONCLUSIONES	86
7 RECOMENDACIONES	87
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9 ANEXOS	99

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**BAPs:** Péptidos bioactivos

**ECA:** Enzima convertidora de angiotensina

**IECA:** Enzima inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina

**GH:** Grado de hidrólisis

**TBARS:** Ácido tiobarbitúrico

**DPPH:** Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**ANCs:** Componentes anti-nutricionales

**LDL:** Colesterol de baja densidad

**RGD:** Secuencia Arg-Gli-Asp

**CaM:** Calmodulina

**ATC:** Ácido Tricloro Ácético

**BSA:** Albumina sérica bovina

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina

## RESUMEN

Con el objetivo de obtener péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi"), se extrajo las proteínas hidrosolubles y se concentraron por precipitación isoelectrica. Las proteínas fueron hidrolizadas con las enzimas alcalasa y el crudo enzimático obtenido de *Bacillus sp.* a pH 8 y 50 °C a 30, 60 y 90 min. Los hidrolizados H30EA, H60EA, H90EA y H30CE, H60CE, H90CE obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). Después, se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos mediante el método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Los hidrolizados proteicos H90EA y H90CE presentaron mayor actividad antioxidante de 10,09 y 5,58 %, y un CI50 de 41,38 y 59,80 µg / mL, respectivamente. Los hidrolizados proteicos de *Lupinus mutabilis* con el crudo enzimático de *Bacillus sp.* presentan menor actividad antioxidante comparado a los obtenidos por alcalasa.

**Palabras claves:** *Bacillus sp*, *Lupinus mutabilis*, alcalasa, proteasas, DPPH, hidrolizados proteicos, tarwi.

## ABSTRACT

In order to obtain bioactive peptides from *Lupinus mutabilis* ("tarwi"), water-soluble proteins were extracted and concentrated by isoelectric precipitation. The proteins were hydrolysed by alcalase and crude enzyme from *Bacillus sp.* to pH 8 and 50 °C at 30, 60 and 90 min. The H30EA, H60EA, H90EA and H30CE, H60CE, H90CE protein hydrolysates were separated by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Then, the antioxidant activity of the hydrolysates obtained was evaluated by the method of radical 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The H90EA and H90CE protein hydrolysates showed higher antioxidant activity of 10,09 and 5,58% and an IC<sub>50</sub> of 41,38 and 59,80 mg / mL, respectively. Protein hydrolysates of *Lupinus mutabilis* with *Bacillus sp.* crude enzyme had lower antioxidant activity than the obtained by alcalase.

**Keywords:** *Bacillus sp.*, *Lupinus mutabilis*, alcalase, proteases, DPPH, protein hydrolysates, tarwi.

## 1 INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos (BAPs) son secuencias de aminoácidos, localizados en el interior de la proteína precursora, capaces de ejercer determinada actividad biológica después de su liberación mediante la digestión gastrointestinal (GI), hidrólisis por microorganismos o enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o plantas (1–3).

Los péptidos bioactivos pueden ejercer diversos efectos biológicos sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. Los BAPs pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo presentar funciones a niveles local y sistémico (4).

En la actualidad, las proteínas alimenticias, procedentes de leguminosas se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, ya que toda fuente de proteínas alimenticias es susceptible de aportar péptidos funcionales. Es así, que varios estudios describen el aislamiento, purificación y caracterización de péptidos provenientes de leguminosas con diferentes actividades tales como: antihipertensiva (5), antioxidante (6), hipocolesterolémica (7,8), anticancerígena (9), inmunomoduladora (10), antiinflamatoria (11) , entre otras.

El género *Lupinus* presenta alto contenido de proteínas, las cuales constituyen una fuente potencial de BAPs. Recientemente, se ha descrito que las proteínas de *Lupinus* pueden ser una alternativa a la soya (12).

*Lupino mutabilis*, "tarwi" o "chocho", es una leguminosa andina reconocida por su elevado contenido de proteínas de 41 a 51 % , mayor a la contenida en la soya (13); sin embargo, el grano contiene alcaloides, que limitan su uso directo en la alimentación humana y animal. Por lo cual, el presente estudio tiene como objetivo obtener péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* con actividad antioxidante, mediante hidrólisis con proteasas de *Bacillus* sp., con el fin de darle un valor agregado a ésta leguminosa andina.



### Objetivo general

- Obtener péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* mediante hidrólisis con proteasas de *Bacillus* sp.

### Objetivos específicos

- 1) Obtener el aislado proteico a partir de la harina de *Lupinus mutabilis*.
- 2) Estandarizar las condiciones enzimáticas de hidrólisis del crudo enzimático de *Bacillus* sp. sobre las proteínas de *Lupinus mutabilis*.
- 3) Determinar la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *Lupinus mutabilis*.

### Hipótesis

- Las semillas de *Lupinus mutabilis* contienen péptidos bioactivos con actividad antioxidante.

## 2 GENERALIDADES

### 2.1 Antecedentes de obtención de péptidos bioactivos a partir de leguminosas mediante hidrólisis enzimática.

Los péptidos derivados de proteínas alimentarias como las leguminosas o fabáceas, han atraído un creciente interés por su bajo peso molecular, alta actividad, fácil absorción, y poco o ningún efecto secundario debido a una rápida eliminación de la sangre (14).

Boschin y col (5) obtuvieron péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) mediante digestión con pepsina de proteínas del garbanzo (*Cicer arietinum*), lupino (*Lupinus albus*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*), soya (*Glycine max*), y lenteja (*Lens culinaria*). Ellos demostraron que las mezclas de péptidos obtenidos con mayor actividad provenían de la digestión de la proteína  $\alpha + \beta$  conglutina del lupino.

Pedroche y col (15), reportaron la misma actividad con proteína de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) hidrolizado con alcalasa.

Sirtori y col (16), identificaron péptidos de *Lupinus angustifolius* con actividad hipotensiva e hipocolesterolémica. También, demostraron la capacidad de proteína conglutina  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  de liberar péptidos estables luego de procesos industriales extremos.

Jakubczyk y col (17), reportaron péptidos con actividad IECA luego de la digestión ,bajo condiciones gastrointestinales (GI), de productos fermentados obtenidos de la fermentación de proteínas de guisantes por *Lactobacillus plantarum*.

Korhonen y Pihlanto (18), aislaron péptidos, Ala- Phe- His, con actividad IECA mediante la fermentación de soya por *Bacillus subtilis*. Estudios similares fueron realizados por Hernández y col (19) obteniendo péptidos como Val-Ala-His- Ile- Asn- Val- Gly- Lys y Tyr- Val- Trp- Lys con la misma actividad.

El frijol lima (*Phaseolus lunatus*) también ha sido identificado como una buena fuente de péptidos IECA cuando es hidrolizado *in vitro* con la proteasa alcalasa (20). La presencia de altos niveles de aminoácidos hidrofóbicos en la proteína de la leguminosa explicaría su potencial para generar péptidos IECA.

Aparte de las propiedades IECA, las leguminosas son también fuentes de péptidos con actividad antioxidante. Así, tenemos que la proteína de lupino debido a su composición química es una fuente potencial de éstos péptidos (12).

Carrasco y col (6), determinaron péptidos con propiedad antioxidante en derivados de proteína de almacenamiento faseolina y lectina de *Phaseolus vulgaris*. Estas proteínas fueron hidrolizadas por tratamiento con pepsina y pancreatina. De acuerdo a los datos de referencia de la FAO/ WHO (21), *Phaseolus vulgaris* tiene un buen contenido de aminoácidos aromáticos Lys, Leu, Ile, Asp y Glu que

sugeriría su potencial como fuente de péptidos antioxidantes. Por otra parte, otros estudios también han reportado liberación de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante a través de hidrólisis con alcalasa y flavourzyme (22).

Valdez y col (23), evaluaron los hidrolizados de proteína de tres cultivares de frijoles azufrados (amarillo azufre) (*Phaseolus vulgaris*). Los concentrados proteicos fueron digeridos con alcalasa, termolisina y pancreatina. Los péptidos obtenidos mostraron una buena capacidad antioxidante con valores de hasta 99% de capacidad de captación de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Yanhong Li y col (24), concluyeron en su estudio que las diversas fracciones peptídicas de los hidrolizados de proteína de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) fraccionados por filtración en Sephadex G-25 y obtenidos mediante hidrólisis con alcalasa exhiben diferentes actividades antioxidantes. Esta actividad se determinó usando los ensayos de poder reductor, inhibición de la oxidación del ácido linoleico y utilizando el método del radical DPPH. Ellos demostraron que la mayor actividad antioxidante encontrada en la fracción IV, también tenía el más alto contenido total de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofobicidad comparado con las otras tres fracciones.

Durak A y col (25), investigaron la actividad antioxidante y antihipertensiva de fracciones de proteína de frejol Adzuki (*Vigna angularis*). Los péptidos fueron obtenidos *in vitro* por el uso de enzimas hidrolíticas bajo condiciones GI. Los

péptidos obtenidos de la fracción globulina mostraron la más alta capacidad de quelar iones de hierro, y los péptidos de la fracción glutelina fueron caracterizados como los más efectivos en la quelación de iones de cobre. Además, los péptidos de la fracción prolamina presentaron mayor actividad antiradical e inhibidora de la ECA ( $IC_{50} = 0,17 \text{ mg / mL}$ ).

Seis péptidos antioxidantes han sido aislados del digerido de  $\beta$ -conglucina de soya usando proteasas de *Bacillus sp.* (26), y *L. plantarum* Lp6 con una capacidad de capturar el radical DPPH en un 50,0 a 60,0 % (1).

También, se ha obtenido péptidos antioxidantes de poroto chino (*Vigna radiata* L.) hidrolizados por proteinasa de *Virgibacillus sp.* SK37 (VH), alcalasa (AH) y neutrasa (NH). Además, la actividad antioxidante de péptidos obtenidos por proteasas VH basado en la captación del radical ABTS, poder reductor de hierro y quelación de metal, presentaron actividades similares a los obtenidos por NH (27).

Varios estudios han reportado que la actividad antioxidante de hidrolizados de proteína y péptidos aislados y preparados de fuentes naturales, en algunos casos es similar o mayor que los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados, como butilado hidroxitolueno (BHA), butilato hydroxianisol (BHT) y propil galato. Por lo tanto, la atención reciente se ha centrado en los antioxidantes de los recursos naturales (28).

Otra de las actividades también investigadas en la familia fabáceas es la hipocolesterolémica, debido a la capacidad que tienen los péptidos de disminuir la solubilidad micelar del colesterol en las células epiteliales intestinales pequeñas reduciendo el nivel del colesterol. Así, numerosos péptidos han sido identificados derivados de la soya con función anticolesterol (29).

Asimismo, se ha identificado algunos péptidos de soya capaces de estimular el receptor de transcripción LDL, éstos péptidos son altamente homólogos a algunos péptidos estables del lupino. Lo anterior, se fundamenta teniendo en cuenta que la proteína  $\beta$  - conglutina del lupino tiene una alta identidad (del 52,0 al 57,0 %) y similitud del 73,0 al 79,0 % con la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$  - conglucina de la proteína de soya, uno de los principales componentes hipocolesterolémicos de ésta semilla (7,8).

Un número de péptidos bioactivos de leguminosas con función moduladora e inmune también han sido identificados. Yoshikawa y col (10), han aislado el péptido soymetide - 13 (Met- Ile- Thr- Leu- Ala- Ile- Pro- Val- Asn- Lys- Pro- Gly- Arg) derivado de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglucina de soya digerida que estimula la fagocitosis en leucocitos polimorfonucleares en humanos. El residuo de Met del amino terminal fue esencial en esta actividad. El péptido, His- Cys- Gln- Arg- Pro- Arg aislado de la digestión de glicina de soya, también muestra actividad inmunoestimulante activando la fagocitosis de neutrófilos en humanos, y estimulando el factor de necrosis tumoral (TNF) cuando fue administrado en ratones (30).

Por otro lado, la soya y otras legumbres tienen un papel en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer. Así, se ha reportado que la lunasina, péptido de 43 aminoácidos, presenta diversas actividades biológicas, entre las cuales se encuentra, la de interrumpir selectivamente la función mitótica en una célula "diana", por lo que resulta un interesante "péptido anticáncer", el cual ha demostrado *in vitro* gran estabilidad en sus propiedades quimiopreventivas (9).

La proteína  $\lambda$ -conglutina de lupino, una globulina rica en 2S azufre, interesantemente tiene cadenas pesadas que muestran una alta secuencia homóloga con la lunasina (16). No obstante, Herrera (31), evaluó la presencia de lunasina o péptidos similares a ésta en extractos proteínicos de cuatro especies de *Lupinus*: *L. albus*, *L. mutabilis*, *L. montanus* y *L. stipulatus*. En las especies de *Lupinus*, este péptido no se encontró. Sin embargo, se presentaron en las fracciones proteínicas de albuminas, globulinas y, en algunos casos, las glutelinas bandas mayores de 5 a 100 kDa que reaccionaron inmunológicamente a los anticuerpos monoclonales de lunasina, por lo que podría decirse que son péptidos similares a ésta.

Por lo que se refiere a la función antiinflamatoria, Millán L y col (11), estudiaron ésta función en hidrolizados de proteína de lupino (*Lupinus angustifolius* L.) obtenidos por medio de la hidrólisis con dos proteasas, Izyme AL y alcalasa. La potencial capacidad antiinflamatoria se determinó *in vitro* por las inhibiciones de las enzimas fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa 2 (COX-2), trombina y transglutaminasa (TG) involucradas en el proceso inflamatorio. Las actividades

inhibitorias más fuertes hacia PLA2 y TG se encontraron en los hidrolizados obtenidos por hidrólisis con Izyme y posteriormente con alcalasa, con la inhibición de más del 70 %. Todos los hidrolizados probados inhibieron más del 60 % la actividad de la COX-2. En ningún caso el porcentaje de inhibición de la actividad de la trombina superó el 40,0 % (11).

En definitiva, las proteínas de leguminosas son una valiosa fuente de péptidos y proteínas alimenticias con actividad biológica o funcional. Sin embargo, no todas las leguminosas han sido explotadas para la salud humana, como es el caso del género *Lupinus* que contiene un número de moléculas bioactivas y compuestos funcionales poco estudiados (32), por lo cual resulta interesante obtener e identificar la presencia de péptidos en especies cultivadas que se usan en la alimentación peruana.

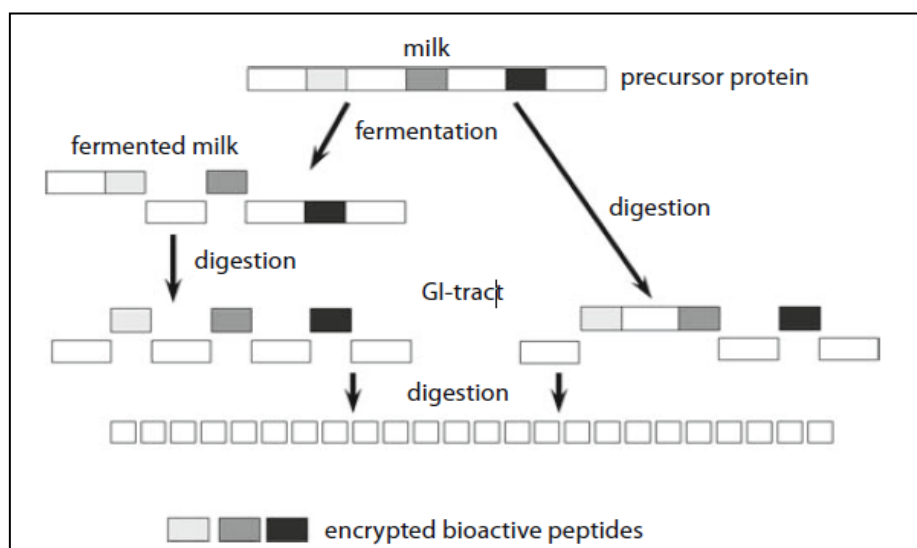
## 2. 2 Péptidos bioactivos

Los BAPs son secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, pero algunos péptidos (lunasina de 43 aminoácidos) tienen cadena larga de aminoácidos. La mayoría de los péptidos bioactivos exhiben atributos biofuncionales específicos, como lunasina que tiene propiedades contra el cáncer, pero se han encontrado algunos péptidos con propiedades multifuncionales, péptidos fosfocaseínicos, péptidos derivados de la leche, que tienen capacidad de



unión mineral ,así como efectos citomoduladores e inhiben el crecimiento de células cancerosas o estimulan la actividad de las células inmunocompetentes y las células intestinales neonatales (1–3).

Mellander (33) fue el primero en describir péptidos bioactivos derivados de los alimentos al informar que la ingestión de péptidos fosforilados derivados de la caseína logra potenciar la calcificación independiente de la vitamina D en neonatos raquíticos . Desde entonces, se han identificado multitudinarios péptidos con diversas bioactividades. Más de 1500 péptidos bioactivos diferentes han sido reportados en una base de datos llamada 'Biopep', así como en la base de datos BioPD (base de datos de polipéptidos bioactivos) se ha informado más de 1,250 péptidos con diferente significado funcional (34).



**Figura 1.** Esquema de las posibles diferencias entre los péptidos liberados de proteínas precursoras por fermentación y / o la digestión gastrointestinal.

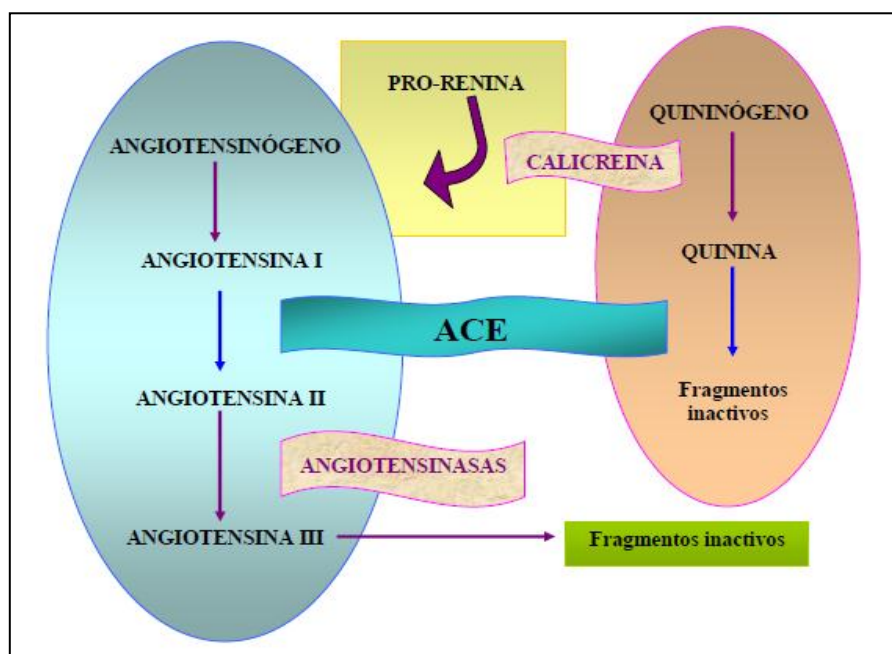
Basados en las propiedades estructurales y en la composición y secuencia de sus aminoácidos, los BAPs pueden desempeñar diversas funciones, tales como antihipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolémicos, opiáceos, antimicrobianos, antitrombóticos, inmunomoduladores, anticancerígenos, de unión a la calmodulina, etc (35).

### **2.2.1 Actividades biológicas de los péptidos bioactivos**

#### **2. 2 .1. 1 Actividad antihipertensiva**

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35 % de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. El mecanismo antihipertensivo más estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la ECA. La ECA es una enzima que cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido). La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua y provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina. La renina libera el decapeptido angiotensina I del sistema renina - angiotensina (Figura 2) (36).

La ECA actúa simultáneamente en el sistema cinina - calicreína catalizando la degradación de las bradicininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, y de esta manera se favorece el incremento de la presión arterial. El incremento de la disponibilidad de bradicininas debido a la inhibición de la ECA puede ser parcialmente responsable del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA sobre la presión sanguínea.



**Figura 2.** Sistemas renina - angiotensina y quinina - calicreína. Acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

La actividad antihipertensiva es la propiedad más estudiada de los péptidos, ya que existe un gran interés por su efectividad en disminuir los niveles de presión sanguínea (37).

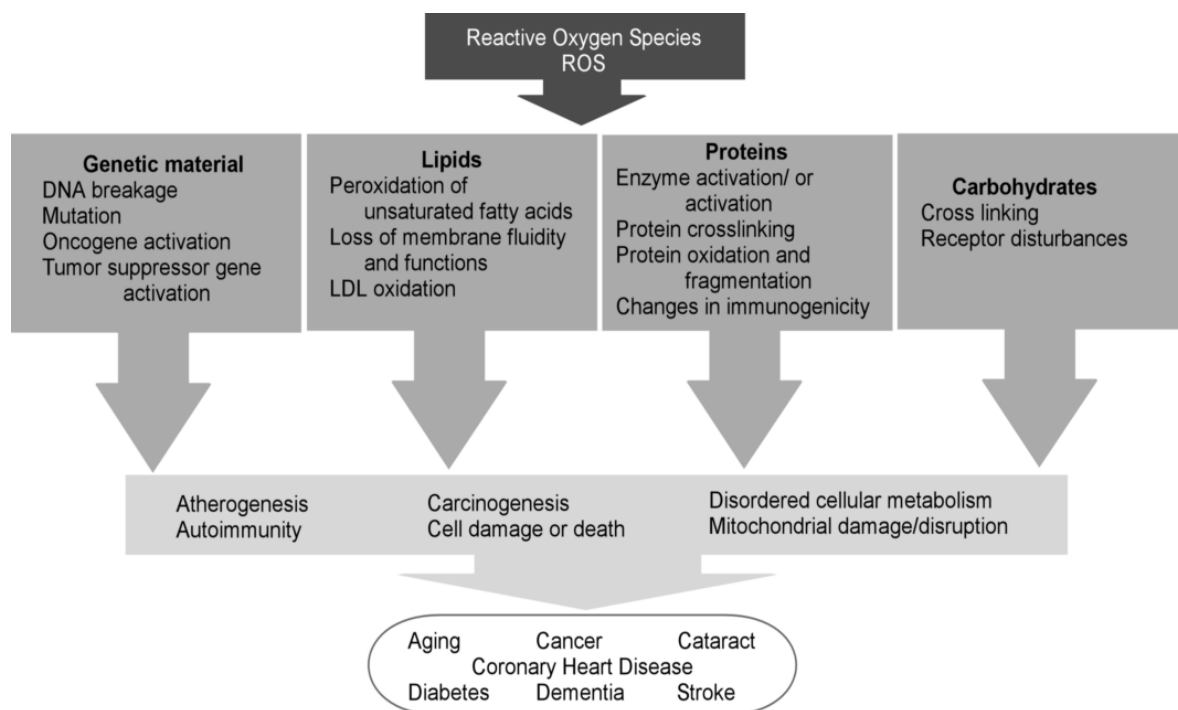
Algunos autores han encontrado que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos (38–42).

Desde una base de datos que contiene 168 dipéptidos y tripéptidos, Wu y col (43) identificaron que los residuos de aminoácidos con cadenas laterales voluminosas o hidrófobos se prefieren para dipéptidos IECA . Para tripéptidos, los residuos más favorables para el extremo carboxilo son aminoácidos aromáticos, mientras que se prefieren los aminoácidos cargados positivamente para la posición central, y los aminoácidos hidrofóbicos para el extremo amino. En la actualidad, muchos inhibidores de la ECA han sido descubiertos a partir de hidrólisis catalizada enzimáticamente en proteínas procedentes de fuentes animales incluyendo caseína bovina, caseína y proteínas de pescado, y también a partir de fuentes vegetales tales como digeridos enzimáticos de algunas proteínas de almacenamiento de semillas.

#### **2. 2 .1. 2 Actividad antioxidante**

El mecanismo exacto de la actividad antioxidante de los péptidos no se ha entendido totalmente. Diversos estudios han mostrado que los péptidos antioxidantes son inhibidores de la peroxidación de lípidos, captadores de radicales libres y quelantes de iones metálicos de transición. Además, se ha reportado que

éstos péptidos mantienen las células a salvo de daños por ROS (Especies reactivas de oxígeno) a través de la inducción de genes (Figura 3) (43).



**Figura 3.** Daño a las moléculas biológicas por especies reactivas de oxígeno que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.

Las propiedades antioxidantes de los péptidos están más relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad. La Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, son ejemplos de aminoácidos que causan la actividad antioxidante. Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones de electrones a los radicales deficientes. Esta propiedad mejora las propiedades captadoras de radicales de los residuos de aminoácidos. Se propone que la actividad antioxidante de péptidos que contienen His está en relación con el donante de hidrógeno, captura de radicales peroxilo de lípidos y / o con la capacidad quelante de iones metales del

grupo imidazol. Asimismo, el grupo SH de la cisteína tiene una acción antioxidante independientemente crucial debido a su interacción directa con los radicales (35).

Sin embargo, algunos péptidos antioxidantes no contienen cualquiera de los residuos de aminoácidos donadores de protones antes mencionados. Por ejemplo, se ha informado que Gln- Gly- Ala- Arg- Leu y Glu tienen un papel importante en la eliminación de radicales. Sin embargo, se necesita investigaciones adicionales para aclarar la relación estructura / función de los péptidos antioxidantes.

Por otro lado, las actividades antioxidantes, así como las biológicas pueden ser afectadas por las condiciones operacionales aplicadas a los aislados proteicos, grado de hidrólisis, tipo de proteasa (44,45), estructura del péptido (46), concentración de péptidos (47) y peso molecular (48). Sin embargo, se ha postulado que la actividad antioxidante total debe atribuirse a los efectos de integración de estas acciones en lugar de las acciones individuales de péptidos (49).

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos (44,50–52). En estos trabajos se encontró que, las fracciones peptídicas y/o los hidrolizados proteicos tienen una mayor actividad antioxidante que las proteínas intactas o la mezcla de aminoácidos, sugiriendo que los péptidos juegan un papel en la acción

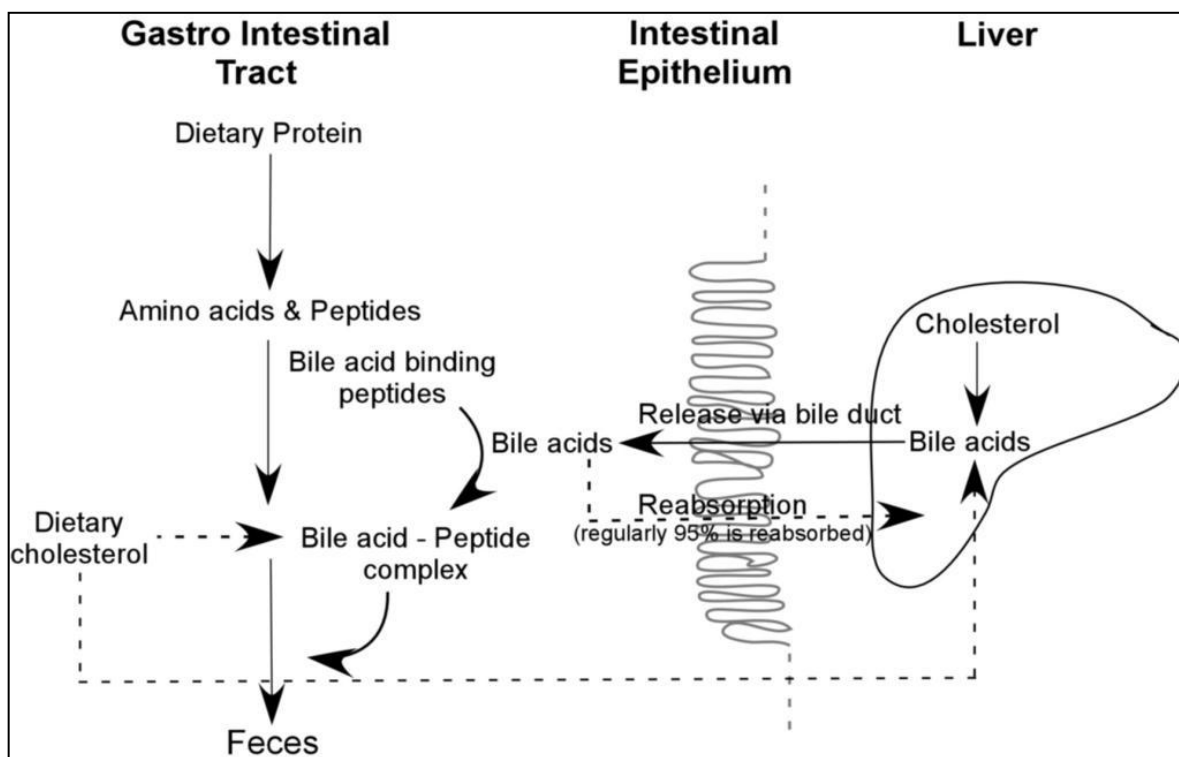
antioxidante que las proteínas que los contienen (53). Por otra parte, los péptidos antioxidantes extraídos de fuentes alimentarias normalmente contienen entre 2 a 20 aminoácidos y muestran pesos moleculares de 500 a 1800 Da (54,55).

### **2. 2.1. 3 Actividad hipocolesterolémica**

La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El efecto hipocolesterolemizante de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones de los mismos:

- Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol.
- Algunos péptidos pueden incrementar la concentración o el número de los receptores LDL, que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta (56–58).

Estudios del efecto hipocolesterolémico de péptidos de soya han resultado en la hipótesis que un péptido con alta capacidad de unión al ácido biliar puede inhibir la reabsorción de la bilis en el íleon y estimular la transformación del colesterol en ácidos biliares en el plasma e hígado, y por lo tanto bajar los niveles de colesterol en sangre (59) (Figura 4).



**Figura 4.** Acción hipocolesterolemia de péptidos de unión al ácido biliar.

#### 2. 2.1. 4 Actividad opiácea

Los péptidos con actividad opiácea, también llamados exorfinas, se definen como péptidos que presentan afinidad por receptores opiáceos y actúan, mediante la unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas. Estos péptidos han sido aislados de proteínas de alimentos (péptidos opioides exógenos) (60). Los péptidos opioides más estudiados son los derivados de proteínas lácteas (caseínas) (61). En las  $\beta$ -casomorfina derivadas de la leche se ha determinado



que pueden participar en la regulación del apetito, modificando la actividad endocrina del páncreas para aumentar la producción de insulina (62).

Los péptidos opioides son importantes para el cuerpo humano. Una de las razones es la estabilidad de éstos hacia la degradación enzimática porque se liberan después de la acción enzimática intestinal en comparación con los péptidos opioides endógenos susceptibles. Otra ventaja es que éstos péptidos por lo general poseen una actividad más débil que los endógenos, causando menos efectos secundarios adversos asociados a menudo con opioides endógenos como dependencia, tolerancia y adicción. Estructuralmente, ambos péptidos opioides exógenos y endógenos varían en la secuencia N-terminal. Los péptidos endógenos tienen la misma secuencia N-terminal de Gly- Gly- Phe, mientras que se han encontrado que varios péptidos opioides exógenos tienen un residuo Tyr en el amino terminal (por ejemplo, Tyr- X- Phe, Tyr- X1- X2- Phe) (63).

#### **2. 2.1. 5 Actividad antimicrobiana**

Los péptidos con propiedades antimicrobianas han sido identificados en una amplia variedad de fuentes, tanto microbianas, animales y vegetales. El modo de acción y efectividad de estos péptidos biológicamente activos como agentes antimicrobianos, varían de acuerdo a sus características estructurales, tamaño, composición de aminoácidos, carga, hidrofobicidad y estructura secundaria.

Un ejemplo de los péptidos antimicrobianos más estudiados son los derivados de la lactotransferrina y la ovotransferrina presentes en la leche y también en el huevo. Éstos péptidos poseen actividad antibacteriana frente a gran variedad de microorganismos entre los que se incluyen *Staphylococcus* spp y *Streptococcus pyogenes* (64). Esta actividad puede ser ejercida al menos mediante tres mecanismos distintos:

- Secuestrando el hierro e impidiendo su utilización por las bacterias.
- Producen alteraciones en la pared bacteriana.
- Estimulan la fagocitosis por macrófagos y monocitos.

Además, los péptidos bioactivos ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana (65).

#### **2. 2.1. 6 Actividad antitrombótica**

La agregación plaquetaria es un paso crítico en la formación de trombos y está mediada por el enlace del fibrinógeno y su receptor, la glucoproteína GPIIb / IIIa de la membrana de las plaquetas, la cual involucra el reconocimiento de la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) del fibrinógeno. Es concebible, por lo tanto, que los

péptidos que contienen la secuencia RGD puedan ser capaces de antagonizar el acoplamiento del fibrinógeno a la GPIIb / IIIa, inhibiendo la agregación de plaquetas. En la secuencia RGD, una unidad catiónica, en este caso el grupo guanidino de la cadena lateral de la Arg y la estructura del ácido  $\beta$ -carboxílico de la Asp, es requerida para la actividad inhibitoria (66).

Por lo anterior, los péptidos que son antagonistas del fibrinógeno y se fijan a GPIIb / IIIa son útiles en la prevención de la trombosis y en los regímenes de tratamiento pos-angioplastia o pos-trombolíticos.

#### **2. 2.1. 7 Actividad inmunomoduladora**

La asociación entre la nutrición y la inmunidad es un hecho reconocido desde hace tiempo. Existen estudios que demuestran que péptidos bioactivos derivados de diferentes fuentes de proteínas ejercen efectos inmunomoduladores *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en la evaluación del efecto de los péptidos e hidrolizados de proteínas específicas en el sistema inmunológico y sólo un número limitado de investigaciones examinan su impacto en la inmunidad inespecífica (innata).

Los péptidos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras más estudiados son también aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos (4). Los efectos de estos péptidos se han comprobado tras la administración intravenosa de los

mismos, pero no existen en la actualidad estudios concluyentes sobre los efectos inmunomoduladores ejercidos tras su ingestión.

#### **2. 2.1. 8 Actividad anticancerígena**

Las proteínas, péptidos y aminoácidos han sido implicados en la prevención de distintos tipos de cáncer. Martínez - Augustin y Martínez de Victoria (61) explican que el modo de acción de estos péptidos sobre las células es muy variado de un tipo a otro y en muchos casos, no se ha descubierto como es su mecanismo de acción en cuanto a la prevención y cura del cáncer.

Algunos péptidos eliminan compuestos mutagénicos (glutación transferasas y glutación peroxidasas), potencian la respuesta inmune (lactoferrina), mientras que otros evitan que las células cancerosas absorban los compuestos necesarios para su proliferación (inhibidor de proteasas Bowman - Birk) y evitan la acetilación de las histonas (lunasina), encontrándose estos dos últimos en proteínas de soya (67).

#### **2. 2.1. 9 Actividad de unión a la calmodulina**

La calmodulina (CaM) es una proteína soluble importante en los seres humanos que se unen con  $\text{Ca}^{2+}$  y regula la actividad de muchas enzimas celulares, incluyendo la adenililciclase, fosfodiesterasa nucleótido cíclico,  $\text{Ca}^{2+}$  - $\text{Mg}^{2+}$

ATPasa, calcinurina, sintasa de óxido nítrico, y muchas proteínas quinasas. Mediante la regulación éstas enzimas actúan en la CaM como regulador dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el metabolismo de nucleótidos cíclicos, transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosforilación - desfosforilación de proteínas de cascadas, transporte de iones, función del citoesqueleto y la proliferación celular. La actividad excesiva de las enzimas dependientes de CaM tales como la proteína quinasa II, conduce al aumento de la fosforilación de proteínas relacionadas con diversas enfermedades crónicas patogénicas. Por tanto, cualquier compuesto capaz de reducir la actividad de la CaM puede inhibir éstas reacciones y suprimir la progresión de la enfermedad (68).

Desde que la CaM está cargada negativamente con una superficie hidrofóbica expuesta en su sitio activo, los péptidos que tienen aminoácidos básicos que dan carga neta positiva básica o péptidos con superficies hidrofóbicas, tienen el potencial de inhibir la CaM.

### **2. 3 Obtención de péptidos bioactivos a partir de hidrólisis enzimática**

Los péptidos bioactivos pueden ser generados de la proteína precursora de múltiples maneras, que incluyen: (a) Digestión gastrointestinal *in vivo*, (b) Hidrólisis *in vitro* por acción de enzimas digestivas, proteolíticas u otras enzimas derivadas de microorganismos o plantas y (c) Fermentación microbiana. Sin embargo, la

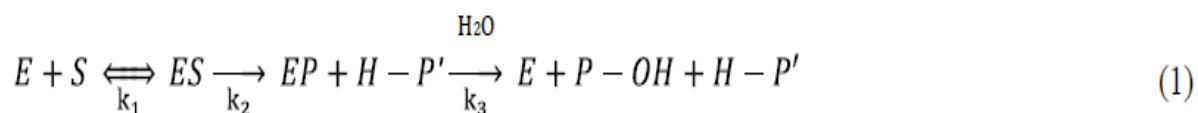
hidrólisis enzimática es el método más efectivo, común y confiable para obtener péptidos bioactivos (69,70).

Muchos de los péptidos bioactivos conocidos han sido producidos usando enzimas gastrointestinales, usualmente pepsina y tripsina (71). Otras enzimas digestivas y diferentes combinaciones de proteasas, incluyendo quimotripsina, pancreatina y pepsina, así como enzimas de fuentes microbianas han sido también utilizadas para generar péptidos bioactivos de varias proteínas (72–74).

El uso de proteasas de grado alimenticio derivado de fuentes microbianas disponibles comercialmente (tales como alcalasa, flavourzyme, neutrasa, etc) para hidrolizar proteínas de los alimentos es ventajoso ya que éstas enzimas son de bajo costo y seguras, y los rendimientos de producto son muy altos (75,76).

En la hidrólisis enzimática un conjunto de etapas transcurre en serie, dando péptidos de tamaño decreciente: *Proteínas* → *proteosas* → *peptonas* → *péptidos* → *aminoácidos*. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio (77). Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas (ecuación 1). Primero, la formación de un complejo enzima- proteína, después la ruptura del enlace amídico liberando un péptido, finalmente el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso

puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (78).



E: enzima, S: sustrato, P y P': péptidos resultantes,  $k_x$ : constante velocidad de reacción

La hidrólisis enzimática de las proteínas depende de varios factores fisicoquímicos. La selección de la enzima hidrolítica apropiada o mezcla óptima de enzimas es vital para obtener resultados previstos. Después de la selección de las enzimas, diversas condiciones de proceso se pueden emplear con el fin de obtener la máxima recuperación de componentes activos. Hay varios factores que influyen directamente en el efecto de las enzimas en la degradación:

La combinación de tiempo y temperatura de incubación del tratamiento enzimático, es posiblemente uno de los factores más importantes a considerar. En el caso de las reacciones enzimáticas, muchas enzimas se desnaturalizan por altas temperaturas. Además, el pH influye en la velocidad de reacción de la enzima. El valor de pH óptimo es el punto donde la enzima es más. Por lo tanto, para realizar la actividad enzimática en el nivel máximo, la temperatura y el pH deben ajustarse a sus condiciones óptimas.

La hidrólisis enzimática ofrece indudables ventajas, como la no existencia de procesos de degradación del sustrato ya que las enzimas son selectivas para un tipo de enlace, los valores de pH y temperatura son moderados (pH están comprendidos entre 5 a 10 y las temperatura entre 40 a 60 °C), se mantiene o mejora el valor nutritivo de la proteína. Por otro lado, la ventaja adicional de la hidrólisis enzimática es la disminución de alérgenos.

### **2.3.1. Enzimas proteolíticas**

Las proteasas pueden ser clasificadas de diferentes maneras: (a) Según su origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico, (b) Por su modo de acción: catalítica, endo o exo-proteasas, las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína y las exoproteasas, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos, (c) En base a su residuo catalítico: serin-, metalo-, cistein-, o aspartato- proteinasas, la naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima - sustrato (79). La tabla 1 muestra algunas proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio (78).



**Tabla 1.** Proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio.

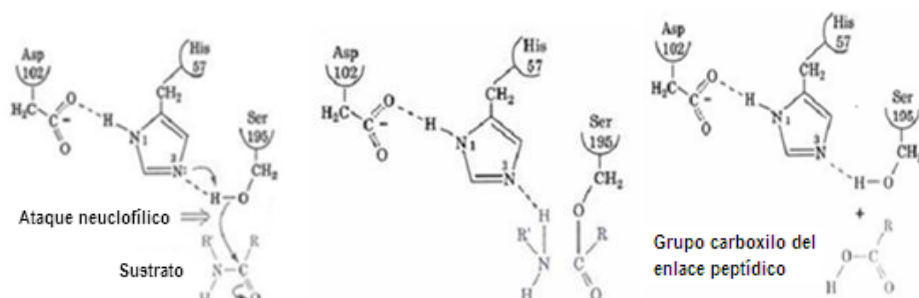
Tipo de proteasa		Nombre	Fuente	Temp. (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
Serinproteasa	Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30 - 60	7 - 9	*Lis ( o Arg)- -
		Quimiotripsina		45 - 55	8 - 9	*Trp (o Tir, Fe, Leu)---
		Elastasa			6 - 8	*Ala---
	Bacteriana	Subtilisina Carlsberg. Alcalasa	<i>B. licheniformis</i>	50 - 60	6 - 10	*AAhf---
		Subst. BPN.	<i>B. amyloliquefaciens</i>	40 - 55	6 - 10	
		Substilisina Novo				
Cisteinproteasa	Plantas	Papaina	Papaya	40 - 75	5 - 8	*Fe (o Val, Leu)- AAhf
		Bromelina	Piña	20 - 65	5 - 8	
		Ficina	Látex de Higo		5 - 8	
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1 - 4	*Fe (o Tir, Leu)*. Trp ( O Fe, Tir)
		Quimosina	Becerro		4 - 6	

	Fúngica	Aspergilo-peptidasa A	<i>Aspergillus saitori</i>	35 - 50	2 - 5	Glu, Asp, Leu *---
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40 - 50	3 - 6	Similar a la pepsina
Metaloproteasas	Animal	Carboxipeptiasa A	Páncreas		7 - 8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arq, Lis
		Neutrasa	<i>B. amyloliquefaciens</i>	40 - 55	6 - 7.5	-Fe, Leu, Val*---
	Bacteriana	Termosilina	<i>B. thermoproteolyticus</i>		7 - 9	-LLe, Leu, Val, Fe*---

\* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato.

AAhf Indica AAs hidrofóbicos

Las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinproteasas, que se dividen en dos tipos principales: las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y las de actividad catalítica tipo subtilisina. En ambos casos, las serinproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico formando un complejo acil - enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre, (Figura 5) (80).



**Figura 5.** Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas por serinoproteasas. (A) Ataque nucleofílico. (B) Complejo acil – enzima. (C) Ruptura del complejo.

La especificidad de la enzima afecta el tamaño, la cantidad, y composición de péptidos y aminoácidos libres, así como su secuencia de aminoácidos (81). Peña y Xiong (45), reportaron que el uso de diferentes enzimas resulta en la formación de una mezcla de péptidos con diferentes GH y en consecuencia diferentes rangos de actividad biológica.

### 2.3.1.1 Proteasas bacterianas

Las proteasas alcalinas bacterianas, como las de género *Bacillus* sp se caracterizan por su alta actividad a pH alcalino, por ejemplo, pH 9, y su amplia especificidad de sustrato. Su temperatura óptima es de aproximadamente 50 °C. Estas propiedades de proteasas alcalinas bacterianas las hacen adecuados para su uso a nivel industrial (79).

Las enzimas del género *Bacillus sp* tienen una amplia especificidad, hidrolizando la mayoría de los enlaces peptídicos, preferentemente aquellos que contienen residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (81). Por lo cual, tienen una amplia aplicación en la hidrólisis de proteínas, para la obtención de péptidos con propiedades biológicas.

## **2. 4 Prospectiva de los péptidos bioactivos**

El uso de péptidos bioactivos como potenciales agentes terapéuticos tiene como grandes ventajas su alta especificidad y su gran actividad. Esto implica que en general tienen poca toxicidad y efectos secundarios, y que se administran en pequeñas dosis, reduciendo así las cantidades de producto a sintetizar a escala industrial. Asimismo, no se acumulan en el organismo, ya que poseen una vida media relativamente corta.

Sin duda, el campo de los péptidos bioactivos es altamente prometedor en el área de los alimentos funcionales. Consumidores, industriales y científicos, ven la posibilidad de mejorar la salud o prevenir enfermedades mediante una alimentación más saludable; la oportunidad de ampliar su mercado y diversificar su oferta con la opción de productos elaborados con un alto valor añadido; así como la oportunidad de encontrar nuevas fuentes que sirvan como materia prima para la generación de estas fracciones proteínicas (2).

Cabe mencionar que diversas empresas se están dando la tarea de incluir en sus productos diversos componentes bioactivos entre ellos se encuentra la compañía Valio Ltd. de Finlandia, donde se desarrolló un producto a base de leche fermentada la cual contiene péptidos bioactivos, Evolus<sup>®</sup>, y presenta un efecto benéfico sobre la presión sanguínea ya que contiene muy poco sodio (2). En todos los casos la acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por Val- Pro- Pro (VPP) y Ile- Pro- Pro (IPP), los cuales purificados o como componentes de los productos hidrolizados han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto.

Algunos péptidos bioactivos son ampliamente utilizados en el diseño de medicamentos, por ejemplo: la industria del cuidado e higiene dental ha aplicado en sus productos los caseinofosfopéptidos con el objetivo de que estos productos tengan un efecto anticariogénico (82). La identificación de péptidos antimicrobianos, vislumbra un amplio y promisorio campo de acción e investigación que podría llevar al reconocimiento, entendimiento y aplicación de estas moléculas en el campo clínico para el futuro tratamiento de múltiples enfermedades de la piel y otros órganos.

## 2. 2 Leguminosas

Las **fabáceas (Fabaceae)** o **leguminosas** son una familia de árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, el fruto, llamado legumbre, es el elemento que mejor caracteriza a las leguminosas. Las fabáceas es una de las mayores familias de plantas con flores con 18,000 especies clasificadas en alrededor de 650 géneros. Esto es poco menos de una doceava parte de todas las plantas con flores conocidas.

Las leguminosas constituyen un grupo muy diverso de plantas con distribución mundial, muchos de ellas cultivadas, desde leguminosas alimenticias (*Vicia*, *Lens*, *Cicer*, *Pisum*, *Lathyrus*, *Phaseolus*, *Vigna*, *Glycine*, *Dolichos*, *Lupinus*, *Arachis*, etc.), forrajeras (*Vicia*, *Medicago*, *Melilotus*, *Trifolium*, etc.), industriales (*Indigofera*, *Astragalus*, *Sarothamnus*, *Crotalaria*, *Trigonella*, etc.), forestales (*Acacia*, *Mimosa*, *Prosopis*, *Piptadenia*, *Robinia*, *Myrocarpus*, *Holocalyx*, *Peltophorum*, etc.) y ornamentales (*Lathyrus*, *Wisteria*, *Lupinus*, *Sutherlandia*, *Erythrina*, *Albizzia*, *Cassia*, *Mimosa*, *Tipuana*, etc.) (83). La tabla 2 reporta la lista de cultivos de leguminosas, según la clasificación de la FAO (84).

**Tabla 2.** Lista de las principales legumbres comestibles y su producción.

<b>Semillas de leguminosas (leguminosas de grano)</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Producción mundial, t ×10<sup>-3</sup></b>
Frijoles secos		1162
Frijol riñón, judía, pinto y navy	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
Frijol lima y mantecoso	<i>Vigna lunatus</i>	
Frijol adzuki	<i>Vigna angularis</i>	
Frijol mungo, grano de oro, grano verde	<i>Vigna radiata</i>	
Grano Negro	<i>Vigna mungo</i>	
Frijol corredor escarlata	<i>Phaseolus coccineus</i>	
Frijol arroz	<i>Vigna umbellata</i>	
Frijol polilla	<i>Vigna acontifolia</i>	
Frijol tepary	<i>Phaseolus acutifolius</i>	
Habas secas	<i>Vicia faba</i>	255
Guisantes secos	<i>Pisum spp.</i>	892
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	478
Caupí seco	<i>Vigna unguiculata</i>	350
Lenteja	<i>Lens culinaris</i>	199
Lupinus	<i>Lupinus spp.</i>	45
Soya	<i>Glycine max</i>	6209

El valor nutricional de las leguminosas se relaciona a su alto contenido de proteínas, minerales, vitaminas, entre otros constituyentes (85,86). El porcentaje de proteínas en las legumbres van desde 20,0 % en los guisantes (*Pisum sativum* L.) y frijol (*Phaseolus spp.*), hasta el 40,0 % en la soya (*Glycine max* L.) Merr.) y lupino (*Lupinus spp.*). El garbanzo (*Cicer arietinum*) contiene similar porcentaje de proteína que el frijol (Tabla 3) (87).

**Tabla 3.** Contenido de proteínas de los principales cereales, legumbres, semillas oleaginosas y fuentes vegetales.

Fuente	Proteína (%)
Soya	35 - 40
Frijol	20 - 30
Garbanzo	20 - 25
Lupino	40 - 55
Trigo (Harina)	8 - 15
Arroz	7 - 9
Maíz	9 - 12
Cebada (descascarado)	8 - 15
Sorghum	9 - 17

No obstante, todas las legumbres son relativamente bajas en aminoácidos azufrados como metionina, cisteína y triptófano, pero las cantidades de otros aminoácidos esenciales, como lisina, son mucho mayores que en los granos de



cereales. Las excepciones son las proteínas de soya y canola que tienen composiciones de aminoácidos equilibrados (Tabla 4) (87) .

**Tabla 4.** Composición de aminoácidos (mg / g proteína) de proteínas vegetales de diferentes semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas.

Semillas	Contenido de aminoácidos (mg / g proteína)									
	Trigo	Cebada	Maíz	Arroz	Sorgo	Soya	Lupino	Frejol	Garbanzo	Canola
Arginina	48	50	43	79	34	73	98	102	98	58
Histidina	24	22	28	24	22	26	27	25	28	31
Isoleucina	34	38	38	44	41	46	45	46	46	23
Leucina	69	71	128	86	138	79	74	73	78	71
Lisina	30	37	27	38	21	65	55	81	71	56
Metionina	16	18	20	22	14	13	8	10	11	21
Cistina	26	24	16	16	16	13	14	12	12	24
Fenilalanina	47	54	50	50	51	50	38	49	60	38
Tirosina	31	33	39	33	28	32	37	29	31	32
Treonina	30	35	37	34	31	39	38	44	39	44
Triptofano	11	16	7	27	13	13	10	10	9	13
Valina	46	53	50	60	52	49	42	51	47	55
Alanina*	37	42	77	59	87	43	37	44	45	44

Ácido aspártico*	51	60	64	99	65	119	113	118	121	73
Ácido glutámico*	309	249	194	199	219	190	227	174	165	181
Glicina*	41	41	38	45	31	42	43	44	42	49
Prolina*	103	115	92	49	84	56	42	42	44	60
Serina*	48	43	51	48	43	52	52	47	53	40

\*,aa no esenciales

### 2. 5. 1 Proteínas de las semillas de leguminosas

Las semillas de leguminosas, denominadas legumbres, acumulan grandes cantidades de proteínas que se almacenan en orgánulos unidos a la membrana, vacuolas de almacenamiento o cuerpos proteicos, células del parénquima de cotiledones, y se someten a la proteólisis en la germinación, proporcionando así aminoácidos libres. Las semillas de las leguminosas contienen varias proteínas comparativamente menores, incluyendo inhibidores de la proteasa y amilasa, lectinas, proteínas de defensa de la lipoxigenasa, y otros, que son relevantes para la calidad nutricional / funcional de la semilla (88).

Las proteínas en las legumbres representan el 20,0 % (peso seco) en guisantes y frijoles y hasta 38,0 a 40,0 % en soya y lupino. De ahí que las legumbres, son los

alimentos más ricos en proteínas y péptidos con actividad biológica o funcional (89).

Tradicionalmente, las proteínas de almacenamiento de las legumbres son clasificadas por Osborne (90) en base a sus propiedades de solubilidad: albuminas ,son solubles en agua y coagulable por calor; globulinas son insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas; las prolaminas son insolubles en agua o soluciones salinas, pero extraíbles en soluciones de alcohol acuoso concentrado (es decir, 60,0 a 70,0 % v / v) , y las glutelinas no son solubles en soluciones neutras acuosas, solución salina o alcohol, pero pueden ser extraíbles en ácido acuoso diluido o soluciones alcalinas. Las glutelinas son encontradas principalmente en granos de cereales como trigo, arroz y maíz.

El contenido de proteínas de cada clase y tamaño molecular puede variar considerablemente dependiendo de la fuente de procedencia ( vegetal o animal) (Tabla 5) (87).

**Tabla 5.** Distribución aproximada de las diferentes clases de proteínas en las leguminosas de acuerdo a la clasificación de Osborne.

<b>Leguminosa</b>	<b>Albuminas (%)</b>	<b>Globulinas (%)</b>	<b>Prolaminas (%)</b>	<b>Glutelinas (%)</b>
Soya		90		
Frijol	15-25	50- 60		
Garbanzo	8-12	53- 60	3- 7	19- 25
Lupino	25	75		

-, información no determinada

A continuación, se describirá los dos principales grupos de proteínas presentes en las leguminosas:

### **Globulinas**

Las globulinas son la mayor fuente proteína en las semillas de leguminosas incluyendo soya, frijol y lupino. En comparación a las albuminas, las globulinas contienen bajos niveles de aminoácidos azufrados.

En la soya, existen dos tipos de globulinas: glicinina y conglicinina, con coeficientes de sedimentación de alrededor 11S y 7S, respectivamente. La 11S glicinina es la mayor proteína en la soya. Las globulinas del frijol comprenden tres grandes grupos distintos; conocidos como legumina (11S), vicilina (7S) y

convicilina (7S) (60). Similar a las globulinas del frijol, los tres mayores grupos también están presentes en los lupinos. Estos son la  $\alpha$ -conglutina (11S) que constituye un tercio de las globulinas totales;  $\beta$ -conglutina (7S) presente en cantidades hasta aproximadamente 45,0 % y  $\delta$  conglutina que es una proteína 7S menor de aproximadamente el 5,0% de las proteínas totales (32,91).

Las globulinas se clasifican generalmente como proteínas 11S y 7S de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación:

El modelo estructural ampliamente aceptado de proteínas 11S se basa en la propuesta de *Vicia faba* (Tabla 6). En este modelo seis monómeros están dispuestos en una estructura compacta antiprisma trigonal, que es necesaria para el empaquetamiento denso de las moléculas en el medio escaso de agua de los cuerpos proteicos. La unidad monomérica de prácticamente todas las leguminas como globulinas consiste de una cadena polipeptídica ácida (que varían en tamaño de 25.000 a 50.000 daltons con disulfuro unido a una cadena de base (generalmente alrededor de 20.000), también llamado  $\alpha$  y  $\beta$  subunidades, respectivamente. Por otra parte, las globulinas 7S o proteínas como vicilina son proteínas oligoméricas (generalmente trímeros) más heterogéneas que las proteínas como legumina, debido a una glicosilación desigual de sus subunidades.

En conjunto, las proteínas 7S muestran un equilibrio de asociación y disociación dependiente del pH y la fuerza iónica. Las proteínas 11S son menos susceptibles

a la disociación, excepto a muy bajo pH o fuerza iónica. En presencia de agentes desnaturalizantes, tales como urea o dodecilsulfato de sodio, tanto las proteínas 11S y 7S liberan sus cadenas polipeptídicas constituyentes. Estos polipéptidos son naturalmente heterogéneos: los que se han purificado hasta homogeneidad a menudo parecen ser mezclas de diferentes especies moleculares, si se examina por otros métodos. La heterogeneidad es evidente en ambos niveles de tamaño y carga y surge de una combinación de dos factores, el origen multigénico de cada globulina de almacenamiento y las modificaciones pos traduccionales de relativamente pocos productos de expresión (92).

## **Albuminas**

Las albuminas son proteínas globulares compactas que consisten de dos cadenas polipeptídicas con valores de peso molecular de 4000 a 9000 Da, para formar una proteína ligada a disulfuro intercatenarios (87). Las proteínas albuminas contribuyen > 50,0 % del azufre total en las semillas de leguminosas, como frijol y lupinos, incluso ellos presentan únicamente el 10,0 y 30,0 % del total de proteínas.

**Tabla 6.** Tipos de proteínas de almacenamiento predominantes en las semillas de leguminosas.

<b>Especies y nombre común</b>	<b>Tipo de proteína de almacenamiento</b>	<b>Lugar de almacenamiento primario</b>
<i>Arachis hypogea</i> (Maní)	11S Arachina, 7S Conarachina	Cotiledones (embrión)
<i>Glycine max</i> (Soya)	11S Glicinina, 7S $\beta$ -Conglicinina	Cotiledones (embrión)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Poroto)	2S Albumina	Cotiledones (embrión)
<i>Pisum sativum</i> (Frejol)	7S Faseolina	Cotiledones (embrión)
<i>Vicia faba</i> (Haba)	11S Legumina, 7S Vicillina & Convicillina, 2S Albumina 7S Vicillina 11S Legumina	Cotiledones (embrión)

### 2. 5. 2 Componentes anti-nutricionales de las leguminosas (ANCs)

Las semillas de leguminosas también contienen ANC's que pueden ser proteicos, es decir, inhibidores de hidrolasa y lectinas, y de naturaleza no proteica. La presencia de ANC's en plantas de cultivo es a menudo el resultado de una adaptación evolutiva que permite a la planta para sobrevivir y completar su ciclo de vida en condiciones naturales.

## ANCs proteicos

Los inhibidores de la hidrolasa se consideran importantes en la determinación de la calidad de las semillas de leguminosas. Los inhibidores de proteínicos más caracterizados son los inhibidores de tripsina (ITs), tanto del tipo Bowman-Birk en *Pisum sativum* y tipo Kunitz en *Glycine max* y los inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa. Los ITs se han demostrado para actuar como agentes protectores contra el ataque de insectos (93).

Las alergias a las legumbres son relativamente poco comunes en los humanos debido a la baja capacidad alergénica de proteínas de reserva, pero podrían desarrollar con un mayor consumo. Por otra parte, los estudios de modificación proteolítica y enriquecimiento en metionina de antígenos de proteína de soya mostraron una reducción de la alergenicidad y una mejora general del valor de la harina.

## ANCs no proteicos

Las semillas de leguminosas contienen una serie de ANCs no proteicos con estructuras y efectos significativamente diferentes. Los más importante de ellos se enumeran a continuación.

Los alcaloides limitan la aceptación de las distintas semillas de leguminosas, como el lupino, tanto por su fuerte sabor amargo y la toxicidad. Las semillas amargas



contienen hasta un 2,0 % de alcaloides, por lo general lupinina, esparteína, lupanina y anagrina. Debido a la solubilidad en agua de alcaloides y su bajo tamaño, es posible eliminarlos de las semillas por remojo y cocción en agua. Un probable papel de alcaloides puede ser también la de proporcionar protección a las semillas de las plagas. Además, los alcaloides extraídos de las semillas de lupino se pueden utilizar para fines biomédicos, farmacológicos y otros (94).

El ácido fítico, mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexadihidrógenofosfato, están presentes en semillas de leguminosas, que constituyen la mayor parte del fósforo total en la semilla. El ácido fítico es responsable de la reducción de la biodisponibilidad de minerales esenciales, formando complejos insolubles que son menos disponibles para la digestión y absorción en el intestino delgado. Por otra parte, los fitatos también se han demostrado para inhibir la actividad de varias enzimas.

Los compuestos fenólicos, como los taninos, pueden entrecruzarse con proteínas al reaccionar con residuos de lisina o metionina por lo que no estará disponible durante la digestión.

Las saponinas son un grupo diverso de compuestos que se encuentran comúnmente en las legumbres. Su estructura general consiste en un grupo esteroide o triterpeno vinculado a una o más moléculas de azúcar. La presencia de ambos grupos polares y no polares proporciona a las saponinas fuertes propiedades tensioactivas que son responsables de sus efectos biológicos

adversos. Un efecto tóxico conocido de saponinas es su capacidad para lisar eritrocitos, así como otras células, tales como los encontrados en la mucosa intestinal, lo que afecta a la absorción de nutrientes.

Las legumbres son inductores de los gases intestinales (flatulencia), debido a la presencia de residuos de  $\alpha$ -Dgalactopiranosil ligados a la fracción de glucosa de la sacarosa. Los animales y el hombre no son capaces de digerir tales oligosacáridos, debido a la ausencia de  $\alpha$ -galactosidasa en su mucosa intestinal. Por consiguiente, los  $\alpha$  - galactósidos pasan al colon y son fermentados por las bacterias intestinales con producción de gas.

## **2. 6 *Lupinus mutabilis***

*Lupinus mutabilis* (tarwi), es una leguminosa anual, perteneciente a la Familia Fabaceae (Tabla 7) género *Lupinus*, conocido como chocho en el norte de Perú y Ecuador, tarwi en el centro del Perú y tauri en el sur del Perú y Bolivia (chuchus en Cochabamba, Bolivia). Ésta leguminosa se cultiva tradicionalmente en los Andes desde los 1,500 m, encontrándose en Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, Chile, Argentina y Perú.

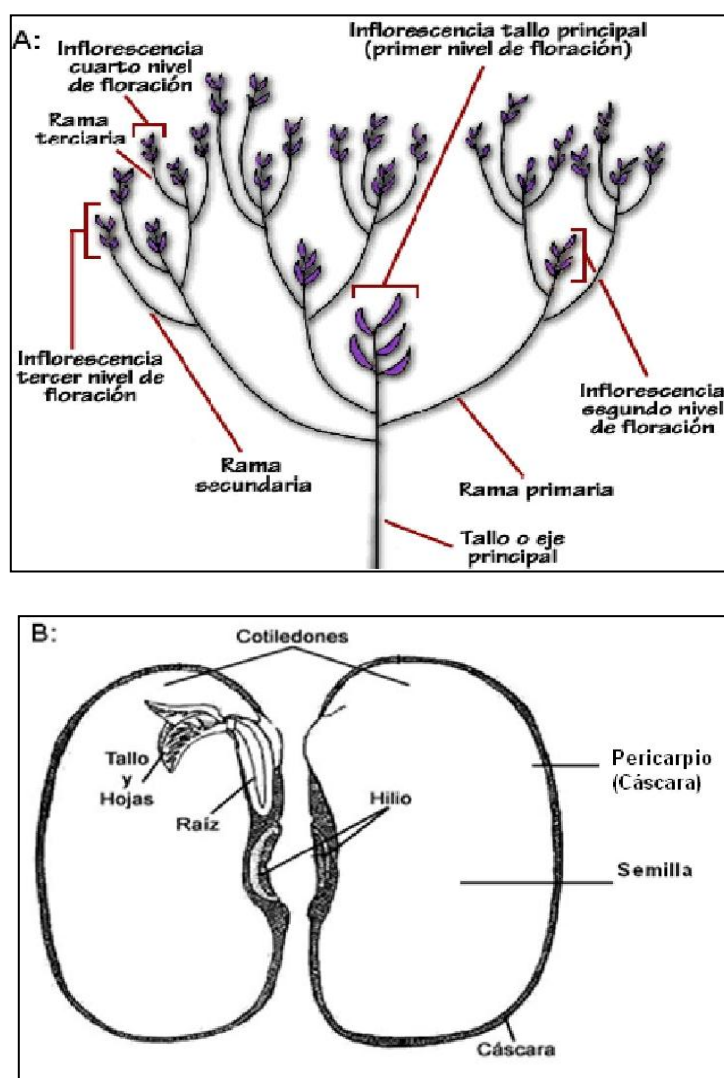
**Tabla 7.** Clasificación taxonómica del tarwi.

<b>Nombre Común</b>	Tarwi, Chocho, tauri
<b>Nombre Científico</b>	<i>Lupinus mutabilis</i>
<b>División</b>	Espermatofitos
<b>Clase</b>	Dicotiledóneas
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Género</b>	<i>Lupinus</i>
<b>Especie</b>	<i>Lupinus mutabilis</i>

### 2. 6. 1 Descripción botánica

Las hojas tienen forma alargada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tienen menos vellosidades. Referente a las semillas de tarwi, están incluidas en número variable en una vaina de 5 a 12 cm y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), miden entre 0,5 a 1,5 cm. La semilla está recubierta por un tegumento endurecido que puede constituir hasta el 10 % del peso total. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón y colores combinados como marmoleado, media luna, ceja y salpicado (95).

Un kilogramo tiene entre 3500 a 5000 semillas, dependiendo del tamaño y el peso de las semillas. La variación en tamaño depende tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo o variedad. La semilla está recubierta por un tegumento endurecido que puede constituir hasta el 10 % del peso total (96). Los niveles de floración y partes de la semilla del tarwi se muestran en la figura 6.



**Figura 6.** A) Niveles de ramificación y floración del lupino blanco. B) Partes de la semilla de lupino.

## 2. 6. 2 Composición química y valor nutricional

El grano de *Lupinus mutabilis* es rico en proteínas y grasas, con mayor frecuencia, su contenido proteico es superior al de la soya por lo que son excepcionalmente nutritivas (Tabla 8) (97). Sus semillas son usadas de forma tradicional en la alimentación humana, debido al alto contenido de proteínas, las propiedades funcionales de sus componentes en matrices alimentarias y las potencialidades nutraceuticas de algunas de sus proteínas (32). Además, es considerado una especie nativa con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial.

Sus proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso, estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía de 41,0 a 51,0 % y el aceite de 14,0 a 24,0 % (13). En base al análisis bromatológico, posee en promedio proteína 35,5 %, aceites 16,9 %, fibra cruda 7,65 %, cenizas 4,15 % y carbohidratos 35,77 % (97,98). Las globulinas corresponden a la mayor fracción proteica, siendo la albúmina la restante.

**Tabla 8.** Porcentajes de la composición química del tarwi, soya y frijol.

Componentes (%)	Tarwi* Amargo	Tarwi* Desamargado	Tarwi**			Soya	Frijol
			Semilla	Cotiledón	Tegumento		
Proteína	41,20	51,06	44,87	49,22	9,39	33,4	22,0

Grasa	17,54	20,37	13,91	15,38	2,20	16,4	1,6
Carbohidrato	28,2	14,1	27,12	27,08	27,5	35,5	60,8
Fibra	6,24	7,47	8,58	2,42	58,35	5,7	4,3
Ceniza	3,98	2,36	5,52	5,89	2,55	5,5	3,6
Humedad	9,90	73,63	9,63	9,67	10,79	9,2	12

\*Peralta y col (99)

\*\* Ortega y col (100)

Ortega y col (100), encontraron que las semillas de lupino contienen nitrógeno total 7,35 %, carbono 55,95 % e hidrógeno 9,83 %. Con base en el contenido de cenizas (5,52 %) se estima que el contenido de oxígeno equivale a 21,35 %. La fracción fibrosa de la semilla está contenida principalmente en el tegumento, representando el 11,03 % de la semilla y tiene un alto contenido de fibra y carbohidratos. En la tabla 9 constan los datos del contenido de proteínas de varias especies de tarwi.

**Tabla 9.** Porcentajes de proteína en varias especies de *Lupinus*.

<b>Lupinus</b>	<b>Proteína (%)</b>
<i>L. mutabilis</i>	39.0 – 52.0
<i>L. angustifolius</i>	33.2 – 35.5
<i>L. hispaniscus</i>	43.9 – 46.9
<i>L. albus</i>	39.2 – 43.3

En cuanto a los contenidos de ácidos grasos del tarwi, la tabla 10 muestra la composición de ácidos grasos en el aceite del tarwi, se destaca la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido alfa linolénico (Omega 3), ácido linoléico (Omega 6) y el oleico (Omega 9) en cantidades significativas (95).

**Tabla 10.** Porcentajes de ácidos grasos de *Lupinus mutabilis*.

Ácidos	%
Oleico (Omega 9)	40,4
Linoleico (Omega 6)	37,1
Linolénico (Omega 3)	2,9
Palmítico	13,4
Palmitoleico	0,2
Esteárico	5,7
Mirístico	0,6
Araquídico	0,2
Behénico	0,2
Erúsico	0,0
Cociente Polisat / Satur	2,0

Acerca de la composición de aminoácidos, la distribución de aminoácidos es relativamente estable, presenta mayor contenido de triptófano y tirosina frente a la soya y el fréjol. La proteína del tarwi contiene cantidades adecuadas de lisina y

cistina (28, 69), y carece de aminoácidos que contienen azufre tales como metionina (Tabla 11) (101).

**Tabla 11.** Contenido de aminoácidos de *Lupinus mutabilis*.

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b><i>Lupinus mutabilis</i></b>	<b>Soya</b>	<b>Fréjol</b>
Isoleucina	4,3	4,5	4,2
Leucina	7,4	7,8	7,6
Lisina	5,3	6,4	7,2
Metionina	0,4	1,3	1,1
Fenilalanina	3,4	4,9	5,2
Treonina	3,5	3,9	4,0
Valina	3,5	4,8	4,6
Histidina	2,2	2,5	2,8
Tirosina	3,5	3,1	2,5
Triptófano	1,8	1,0	-

\* Expresado en g/16g de N

Por lo que se refiere al contenido de alcaloides, en el tarwi varía de 0,02 a 4,45 %; los alcaloides reportados son los quinolizidinicos tales como: lupina, esparteína, 13- hidroxilupanina, 4-hidroxilupanina, isolupanina, entre otros. Las lupininas (27,0 a 74,0 %) están presentes en mayor proporción. Estos alcaloides quinolizidinicos otorgan el sabor amargo a la semilla y son considerados sustancias antinutritivas,



que hasta el momento han sido el mayor obstáculo para la utilización del tarwi en la alimentación humana y animal. Se reporta que las variedades mejoradas denominadas dulces tienen un contenido de alcaloides menor al 1,16 % (102).

Se considera que un contenido de 0,02 % de alcaloides remanentes después del desamargado es el límite que se puede aceptar como seguro para el consumo humano. Por otro lado, el sentido del gusto humano puede identificar una concentración de 0,1 % de sabor amargo en la semilla, lo que evita el consumo y protege de una posible intoxicación.

Además de los alcaloides, en las leguminosas existen otros 27 componentes tóxicos o llamados componentes antinutricionales, como los inhibidores de proteasas y el ácido prúsico (HCN). Sin embargo, no se han encontrado presentes en cantidades significativas en el tarwi, o son eliminados en el proceso de desamargado.

Las vitaminas y minerales del tarwi tienen una gran similitud con otras semillas de leguminosas en relación a vitaminas y minerales, encontrándose una mayor concentración no tan significativa de fósforo y magnesio. Por tanto, el tarwi es una fuente importante de fósforo, magnesio y potasio para el hombre. El calcio se encuentra principalmente en la cáscara, por tanto si se requiere de este mineral, lo aconsejable es consumirlo completo, al contrario del fósforo que se encuentra en el núcleo del grano de tarwi (Tabla 12) (103).

**Tabla 12.** Contenido de minerales en el grano de *Lupinus mutabilis*.

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/g</b>	<b>Microelementos</b>	<b>mg/kg</b>
Calcio	1,07 - 1,53	Hierro	46,00 - 73,3
Magnesio	2,00 - 3,02	Zinc	40,00 - 51,66
Sodio	0,25 - 0,75	Manganeso	21,33 - 29,10
Potasio	11,06 - 13,56	Cobre	4,00 - 12,10
Fósforo	0,44 - 0,88		

El grano de tarwi también es una valiosa fuente de vitamina B en sus formas como tiamina (B1), riboflamina (B2), niacina (B3), asemejándose a otros tipos de leguminosas.

### **2. 6. 3 Modos de empleo**

Uno de los principales problemas para el consumo directo del tarwi es la presencia de alcaloides que le dan un sabor amargo al grano y pueden ser tóxicos, por lo que no deber ser consumido sin un proceso previo de desamargado. Cuando el grano ha sido desamargado tiene una diversidad de usos:

- Consumo humano.- se consume en platos tradicionales de nuestra serranía como es el ceviche de tarwi. Se han desarrollado métodos para elaborar yogur, galletas, pan.

- Uso industrial.- La harina de tarwi puede ser usada en panificación (15.0 %), para mejorar considerablemente el valor proteico y calórico del producto; permite una mayor conservación del pan, debido a la retrogradación del almidón y un mayor volumen por las propiedades emulgentes de la lecitina presente en el tarwi desamargado.
  
- Uso medicinal.- Los alcaloides (esparteína, lupanina, lupanidina, etc.) se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales. Ocasionalmente los agricultores utilizan el agua de cocción del tarwi como laxante y para el control de plagas en plantas.
  
- Uso agronómico.- Por su contenido de alcaloides se siembra a menudo como cerco vivo o para separar parcelas de diferentes cultivos, previniendo el daño por animales. Debido al contenido de alcaloides, como plaguicida natural, ayudando a que insectos y bacterias no ataquen a las plantas.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

- Reactivo de Folin Ciocalteu (Merck)
- Reactivo ATC (Ácido Tricloro Acético) (Merck)
- Micropipetas 10, 100, 1000 mL (Merck)
- Pipetas de 1, 2, 5, 10, 20 mL (Pirex)
- Beakers de 25, 50, 100, 500 mL (KIMAX)
- Fiolas de 10, 25, 50, 100 mL (Pirex)
- Probetas de 50, 100, 250 mL (Pirex)
- Matraces de 50, 250, 500 mL (Kimax)
- Balanza electrónica
- Solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Merck)
- Metanol absoluto (Merck)
- TSA (Agar Trypticase Soya) (Merck)
- Cámara de electroforesis
- Centrífuga

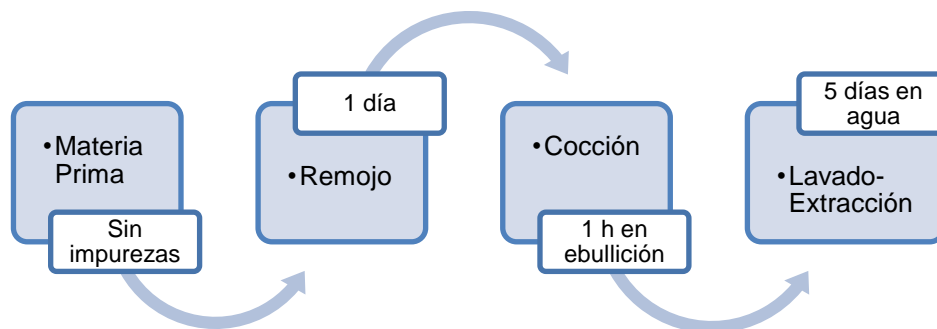
## 3. 2 MÉTODOS

### 3. 2. 1 Obtención de la harina de las semillas de *Lupinus mutabilis*

Para la obtención de la harina de tarwi (Anexo 1), se compro granos de tarwi de un mercado en la provincia de Julcan departamento de La Libertad, los granos fueron procesados siguiendo los siguientes pasos:

#### 3. 2. 1. 1 Deslupinización

Se usaron los procedimientos de deslupinizado propuestos por Mujica y Sven (97) que consiste en la aplicación del método denominado "Cusco Mejorado" modificado, con el cual se logra disminuir la pérdida de proteínas. En la figura 7 se presentan las operaciones:



**Figura 7.** Diagrama de flujo de deslupinizado del tarwi.

Se seleccionaron los granos para luego ser sometidos a:

- Remojo. El tarwi se hidrata en agua destilada por un periodo de 1 día, con la finalidad de ablandar la estructura del grano y facilitar la transferencia de calor en la cocción.
- Cocción. Los granos de tarwi fueron sometidos a ebullición, por una hora, tal como lo recomienda Mujica y Sven (97). Esta operación permite la ruptura de las cubiertas (cascaras) facilitando la difusión de los alcaloides por la desnaturalización parcial de las proteínas (rotura de las estructuras complejas de las proteínas) a las que están unidas.
- Lavado. Después de la cocción los granos de tarwi se lavaron con agitación constante a 120 rpm a 40 °C por 5 días cambiando el agua cada 8 h.
- Descascarado: Éste procedimiento consistió en retirar las cáscaras de los granos de tarwi deslupinizados.

### **3. 2. 1. 2 Secado**

La deshidratación se realizó en estufa a 40 °C por 48 h. Con el fin de evitar la oxidación de las proteínas a la vez se añadió sulfito de sodio al 0,01 % (Anexo 2).

### **3. 2. 1. 3 Molienda**

Posteriormente se procedió a la molienda, utilizando un molino artesanal como premolienda, y luego el molino de martillo. Éste proceso tiene por finalidad facilitar la extracción proteica y la separación de componentes no proteicos, por tanto incrementar el contenido de proteínas. Después se tamizo con la malla N° 60 (0.24 mm).

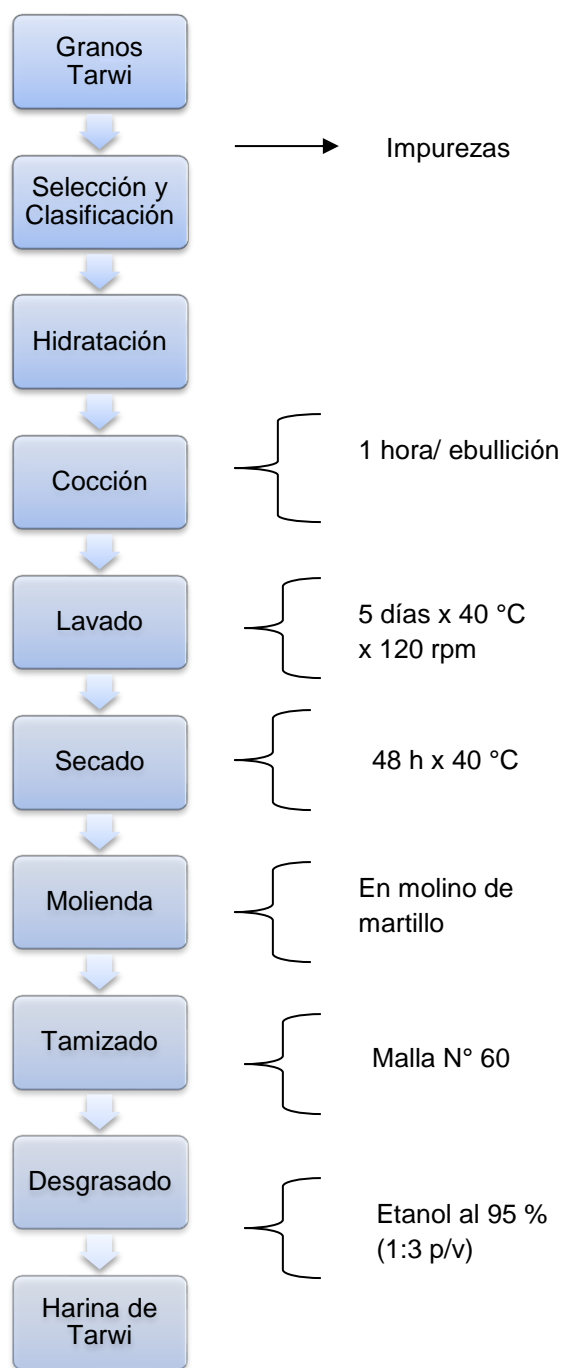
#### 3. 2. 1. 4 Desgrasado

Para la extracción de proteínas es necesario que la harina a solubilizar tenga bajo contenido de grasas. La operación se realizó inmediatamente después del tamizado. La harina se lavó con etanol al 95 % en una relación de harina: solvente de 1: 3 por tres lavados consecutivos durante 5 h cada una. Finalmente, la harina semi - desgrasada se volvió a moler y tamizar.

Al finalizar el proceso, se evaluó el rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso granos g inicial} - \text{Peso harina g final}}{\text{Peso grano g inicial}}$$

En la figura 8 se presenta el proceso para la obtención de la harina de tarwi



**Figura 8.** Diagrama de flujo de la obtención de harina de tarwi.



### **3. 2. 2 Análisis proximal de la harina de *Lupinus mutabilis***

El análisis proximal, se realizó en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, según el método de la AOAC 1997.

### **3. 2. 3 Obtención del aislado proteico a partir de la harina de *Lupinus mutabilis***

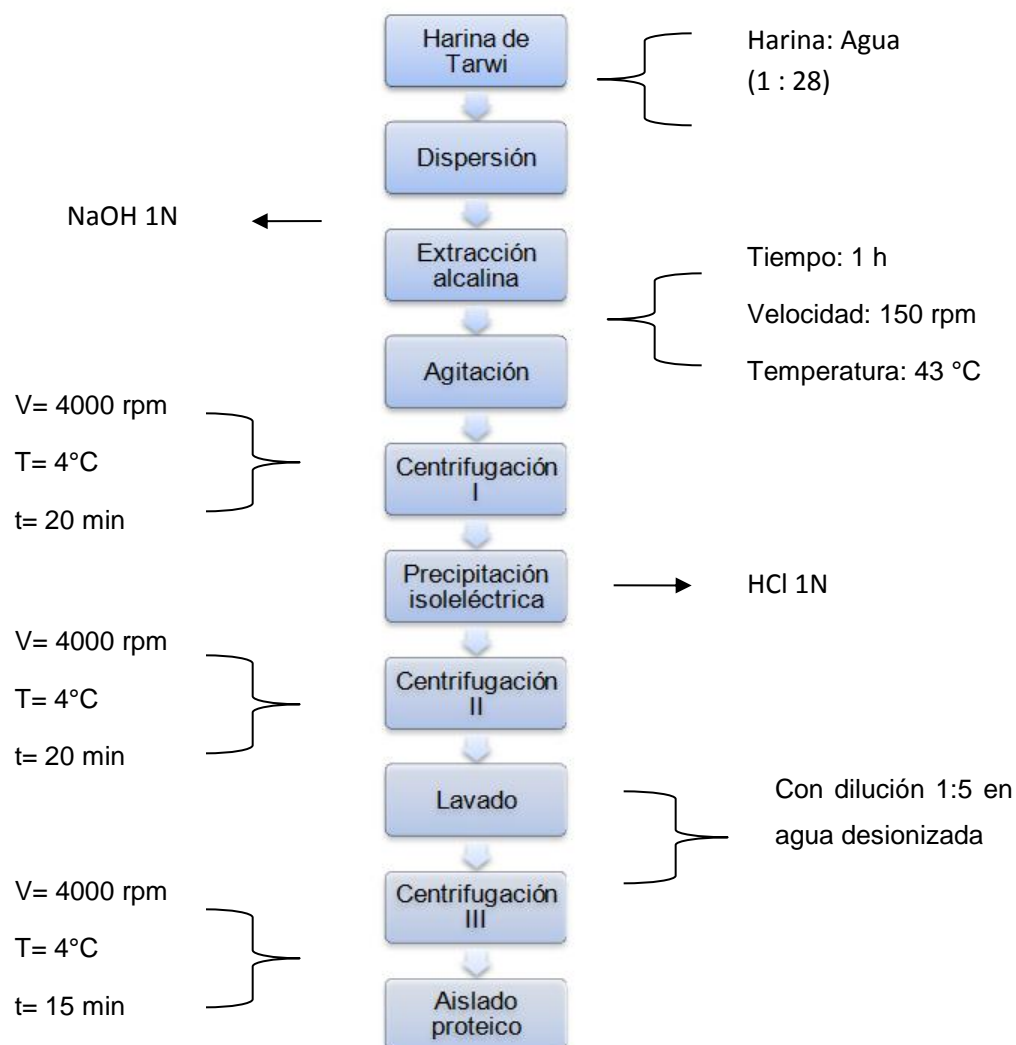
#### **3. 2. 3. 1 Obtención de las proteínas hidrosolubles**

Para la obtención de proteínas solubles (Anexo 3), la harina deslupinizada y semi-desgrasada se dispersó en agua desionizada (1: 28, p / v) y la dispersión se ajustó a pH 9,3 con NaOH 1N con el fin de solubilizar las proteínas en una relación 1: 28 (p / v). La dispersión se realizó a 150 rpm, 43 °C y 1 h. Transcurrido el tiempo de extracción, se centrifugó a 4000 rpm, 4 °C por 20 min. El sobrenadante se separó y se ajustó hasta el punto isoelectrico (pH 4,3) con HCl 1N, el precipitado obtenido se centrifugó a las mismas condiciones descritas anteriormente. El precipitado obtenido, se lavó por tres veces usando agua desionizada en una relación 1: 5 (p/v). Se centrifugó a 4000 rpm, 4 °C y 15 min. Los precipitados obtenidos fueron secados a 30 °C por 48 h y, almacenados a temperatura ambiente hasta su uso (23–25).

En la figura 9 se resume el proceso de extracción del aislado proteico de tarwi.

Al igual que en la obtención de la harina de tarwi, se evaluó el rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso harina g inicial} - \text{Peso proteína g final}}{\text{Peso harina g inicial}}$$



**Figura 9.** Diagrama de flujo para la obtención del aislado proteico de tarwi.

### **3. 2. 3. 2 Cuantificación de proteínas hidrosolubles mediante método Bradford**

El máximo de absorbancia del colorante azul de Coomassie en solución ácida varía de 495 a 595 nm tras añadir solución de proteína a la cual se adhiere, el colorante se torna de rojizo a azulado debido a la estabilización de la forma aniónica del mismo por interacciones hidrofóbicas e iónicas. El azul de Coomassie reacciona principalmente con residuos de arginina y en menor grado con residuos de histidina, lisina, triptófano y fenilalanina. El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra (105).

La cuantificación de proteínas se determinó mezclando 10  $\mu$ L de muestra con 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford. Como control se utilizó agua bidestilada. Los tubos fueron sometidos a agitación mecánica durante 30 s, cubiertos con papel aluminio y se dejaron reaccionar en una zona oscura a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido el tiempo de reacción se realizó la lectura a 595 nm. Se empleó como estándar albumina sérica bovina (BSA), se elaboró una curva de calibración con un rango de concentración de 0 a 1,4 mg / mL.

La concentración de proteína se determinó directamente por interpolación de la lectura obtenida en la curva de calibración adjunta en el anexo 4.

$$P \text{ (mg BSA / mL)} = (\text{Abs}_{\lambda 595} - 0.663) / 0.016$$

$$R^2 = 0.992$$

### **3. 2. 3. 3 Separación de las proteínas hidrosolubles mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE).**

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en función de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico.

#### **Procedimiento**

El SDS–PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli y col (106) modificado. Para lo cual se preparó gel al 10 % siendo la composición final del gel en 20 mL: agua estéril 9,8 mL, acrilamida y N, N-bis metileno acrilamida (SIGMA) 40 %, buffer Tris–HCl 1,5 M (pH 8,8) 5,2 mL, perulfato de amonio 1% (APS) 100 µL y tetrametiltilendiamina (TEMED) 20 uL.

Cada 500 mL de buffer de corrida (pH 8,8) contenía Tris HCl 1,51 g, glicina 7,2 g y SDS 0,5 g. A las muestras se añadió igual volumen de buffer muestra (Tris–HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS 2 %, y azul de bromofenol 0,02 %) y se cargaron en el gel. Como muestra control se utilizó BSA 1 µg / µL. La separación de proteínas y péptidos fue a 90 V por 2 h. Luego, los geles se tiñeron con solución colorante que

contenía: azul brillante de coomassie 1g, ácido acético 100 mL, metanol 500 mL y agua destilada 400 mL por 45 min. Luego, se decoloró con metanol 50 mL, agua destilada 860 mL y ácido acético glacial 90 mL.

### **3. 2. 4 Identificación de cepas de *Bacillus sp* con mayor actividad proteolítica**

Para la elección de la mejor cepa productora de proteasas de la base de datos del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM se empleó la técnica de medición de actividad proteolítica en sustrato sólido (107). Para lo cual, se tomaron 15 cepas del género *Bacillus sp.*, y se cultivaron en medio sólido de agar nutritivo suplementado con 1 % de gelatina. Se sembró en línea recta y se incubó a 37 °C por 12 h. Después, se añadió a la placa solución al 15 % de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) en ácido clorhídrico (HCl) al 20 % durante 5 min. Se evaluó la actividad midiendo los halos de actividad con ayuda de Vernier.

### **3. 2. 5 Producción de proteasas de *Bacillus sp.***

La cepa seleccionada con mayor actividad proteolítica en sustrato sólido, fue crecida bajo las condiciones óptimas reportadas para la producción de proteasas (pH 9, 40 °C y 48 h).

Se utilizó 5 mL de medio Horicoshi a pH 9 conteniendo glucosa 1%, peptona 0,5%, extracto de levadura 0,5 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{MgSO}_4$  0,02 %,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1% y sembrado de una colonia de la cepa TFJ41 e incubado a 40 °C por 10 h (110). Se adicionó 5 mL del medio a un matraz de 500 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo. Se dejó incubar a 150 rpm, 40 °C por 48 h. Después, se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C por 20 min. Se separó el sobrenadante (crudo enzimático). Se determinó la actividad enzimática y el contenido de proteína. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces.

### 3. 2. 5. 1 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la proteasa fue determinado por el método Anson (110,111) con algunas modificaciones. La solución de enzima (0,5 mL) fue mezclado con 0,5 mL de sustrato (caseína 1% en buffer Tris - HCl 50 mM pH 8) a 50 °C por 1 h. Después de la incubación, se adicionó 0,5 mL de una solución de ATC (Ácido Tricloro Acético) 10 %, para detener la reacción enzimática, se homogenizó y se dejó reposar por 5 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se añadió 1 mL de NaOH. Finalmente, se agregó 0,5 mL de reactivo de Folin - Ciocalteu e incubó por 20 min a temperatura ambiente y se midió en un espectrómetro a 620 nm. Los experimentos de control se realizaron sin adición de enzima.

Para determinar la actividad enzimática de las muestras se elaboró una curva de calibración con L-tirosina. Para ello se prepararon concentraciones conocidas de tirosina, las cuales se leyeron a 620 nm, luego de incorporar el reactivo de Folin Ciocalteu. Con los resultados se realizó un análisis de regresión a los datos, luego de lo cual se elaboró la curva de calibración (Anexo 5).

Para realizar los cálculos se consideró la siguiente ecuación:

$$U = \frac{\frac{\text{Abs encontrada}}{0,002} \times \text{Vol. total rxn enzimática} \times \text{Vol. usado rxn colorimétrica}}{\text{Vol. muestra rxn enzimática} \times \text{Vol. muestra rxn colorimétrica} \times \text{Tiempo (min)}}.$$

U: Unidades Internacionales para la actividad proteolítica, donde una unidad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina por mililitro en un minuto.

Donde:

Volumen total de la reacción enzimática = 1,5 mL

Volumen usado en la reacción colorimétrica = 2,0 mL

Volumen de la muestra para la reacción enzimática = 0,5 mL

Volumen de la muestra en la reacción colorimétrica = 0,5 mL

0,002 = Coeficiente de extinción molar de la tirosina a 620 nm

**Nota:** En el volumen total de la reacción se consideró el volumen del agente precipitante.

### **3. 2. 6 Hidrólisis enzimática de las proteínas hidrosolubles de *Lupinus mutabilis***

La hidrólisis enzimática del aislado proteico de *Lupinus mutabilis* fue realizado usando el método Pedroche y col (15), para lo cual se utilizó la proteasa de la cepa TJF41 de *Bacillus sp*, y se comparó con una enzima comercial, alcalasa (DELVOLASE®). Los parámetros de hidrólisis fueron a pH 8, 50 °C. Los experimentos de control se realizaron sin adición de enzimas. Los tiempos de la reacción de hidrólisis fueron 30, 60 y 90 min (112,113), denominándose H30EA, H60EA, H90EA a las proteínas de tarwi hidrolizadas con alcalasa y H30CE, H60CE , H90CE a las hidrolizadas con el crudo enzimático de *Bacillus sp* en los tiempos descritos anteriormente. Luego del último tiempo de reacción, la enzima fue inactivada con la adición de ATC 10 %. Los hidrolizados fueron centrifugados a 13000 rpm por 5 min (15,27,114,115).

#### **3. 2. 6. 1 Determinación de péptidos solubles mediante método de Lowry**

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de péptidos solubles de las proteínas de tarwi hidrolizadas con alcalasa y crudo enzimático, se utilizó la técnica descrita por Lowry y col (116), la cual se basa en la reacción del péptido con  $\text{Cu}^{++}$  en condiciones alcalinas para formar  $\text{Cu}^+$  (Reacción de Biuret) y de la producción del



ácido fosfomolibdato fosfotúngstico (reactivo de Folin) por aminoácidos aromáticos.

En esta técnica se adicionó 20 µL de muestra a una solución de 100 µL que contenía carbonato de sodio al 2 %, sulfato de cobre al 1 % y tartrato de sodio y potasio al 2 % en NaOH 0,1 N, se dejó reposar 15 min en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 10 µL del reactivo de Folin y se dejó reaccionar por 30 min en oscuridad. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 580 nm.

La concentración de péptidos se determinó comparando las absorbancias contra una curva patrón de BSA con un intervalo de 0 a 0.02 mg BSA / mL, la gráfica se muestra en el anexo 6.

Cálculos:

$$P \text{ (mg BSA / mL)} = (\text{Abs}_{\lambda 580} - 0.107) / 0.002$$

$$R^2 = 0.999$$

### 3. 2. 6. 2 Determinación de nitrógeno soluble

Para determinar el grado de hidrólisis de forma parcial de las proteínas de tarwi hidrolizadas con alcalasa y crudo enzimático, se usó el método de Kim y col (117). El valor fue estimado mediante la medición de nitrógeno soluble en 10 % de ATC. Para determinar el contenido de Nitrógeno soluble en TCA las muestras se

centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. A continuación se realizó el agregado de ATC hasta una concentración final de 10 %, seguido de una centrifugación a 13 000 rpm durante 5 min. Se separó el sobrenadante y se hizo reaccionar con el reactivo de Folin Ciocalteu. Se empleó la curva de L- tirosina según lo descrito anteriormente. La absorbancia se midió a 620 nm.

### **3. 2. 6. 3 Separación de péptidos mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE)**

El SDS–PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli y col (106) modificado. Para lo cual se prepararon geles al 10 % y 5 % siendo la composición final del gel al 10 % en 15 mL: agua estéril 7,5 mL, solución de acrilamida y N, N - bis metileno acrilamida 40% (SIGMA) 3,75 mL, buffer Tris–HCl 1,5 M (pH 8,8) 3,9 mL, SDS 10 % 75  $\mu$ L, persulfato de amonio 10% (APS) 75  $\mu$ L y TEMED 15  $\mu$ L.

La composición del gel 5 % en 5 mL fue: agua estéril 3,04 mL, acrilamida y N, N - bis metileno acrilamida 40% (SIGMA) 0,625 mL, buffer Tris–HCl (pH 6,8) 1,5 M 1,25 mL, SDS 10 % 50  $\mu$ L, amonio persulfato (APS) 50  $\mu$ L y TEMED 5  $\mu$ L.

El buffer de corrida (pH 8.8) y el buffer de muestra fueron de la misma composición como se describió anteriormente. Se cargaron a los geles la proteína de tarwi sin hidrolizar, y las muestras hidrolizadas con alcalasa y crudo enzimático en los diferentes tiempos de reacción. La separación de los péptidos fue a 90 V

por 2 h. Luego del tiempo transcurrido, los geles se tiñeron con solución colorante: azul brillante de coomassie 1 g, ácido acético 100 mL y solución de metanol 500mL y agua destilada 400 mL por 45 min. Luego se decoloró con solución: metanol 50 mL, agua destilada 860 mL y ácido acético glacial 90 mL.

### **3. 2. 7 Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de las semillas de *L. mutabilis***

La actividad antioxidante de los productos hidrolizados fue determinado usando el método basado en la reducción del radical libre estable de DPPH. El Fundamento del método consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul - violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante, la absorbancia es medida a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (24,35).

La actividad antioxidante se evaluó a las muestras hidrolizadas con alcalasa y crudo enzimático en los diferentes tiempos de reacción. Con el fin de realizar las comparaciones de la actividad antioxidante con Trolox, asimismo, medir el CI50 se prepararon concentraciones de 1,6; 3,3; 5,0; 6,6; 8,3  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para cada muestra. Los volúmenes de las muestras se mezclaron con 2,8 mL de la solución del radical DPPH 0,05 mM y se completó con metanol hasta obtener el volumen total de reacción de 3 mL. La serie de tubos fue cubierta con papel aluminio para

proteger de la luz a temperatura ambiente y se dejó bajo agitación a 160 rpm por 30 min. Después, se midió la absorbancia de cada tubo a 515 nm. Como control positivo se usó una solución de Trolox 0,5 mM (6 - hidroxí- 2, 5, 7, 8 tetrametilcromo - 2 ácido carboxílico 97 %) preparada bajo las mismas condiciones de los productos hidrolizados (Anexo 7).

El porcentaje de inhibición o captación de radicales libres fue calculado como:

$$\% \text{ inhibición} = A - B / A \times 100$$

Dónde:

A) Lectura de absorbancia del DPPH

B) Lectura de la muestra

La concentración requerida para el 50 % de inhibición del radical libre DPPH (IC<sub>50</sub>) fue calculada mediante la ecuación de la gráfica de concentración de cada uno de los hidrolizados obtenidos y Trolox vs % de inhibición.

Cálculos:

Ecuación de la gráfica:  $y = mx + b$

$$CI_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Donde:

m= Valor de la pendiente

X= El valor de CI<sub>50</sub>

## 4 RESULTADOS

### 4. 1 Obtención de la harina de las semillas de *Lupinus mutabilis*

En el proceso de obtención de harina de tarwi el rendimiento registrado fue de 37 %, asimismo, se observó que hubo pérdidas de muestra durante el proceso de obtención de la harina. El proceso de tamizado causó pérdida del 26 % y la molienda, 5 %.

### 4. 2 Análisis proximal de la harina de *Lupinus mutabilis*

El análisis proximal de la harina de tarwi fue realizado en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM según el método de la AOAC 1997 utilizando la harina deslupinizada, pero sin desgrasar, se observa el alto contenido de proteínas (46,37 %) y grasas (31,57 %) (Anexo 8).

**Tabla 13.** Composición proximal de la harina de tarwi.

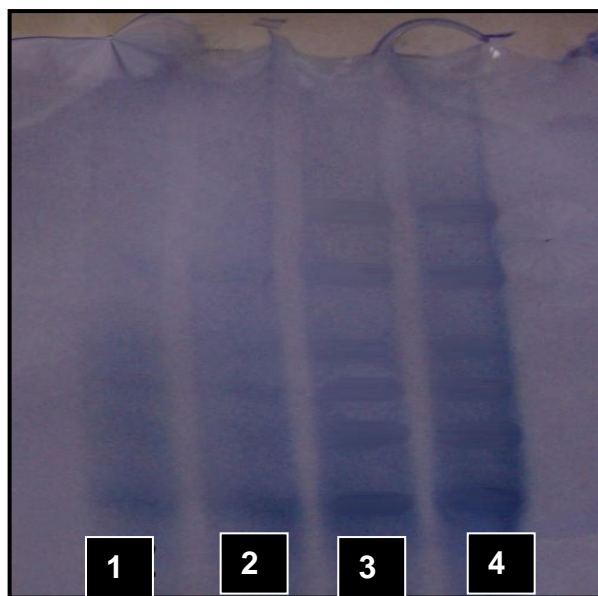
Componentes	%
Humedad	6,980
Lípidos	31,570
Proteínas	46,370
Ceniza	5,140
Fibra	1,735
Carbohidratos	8,220

#### 4. 3 Obtención de aislado proteico a partir de la harina de *Lupinus mutabilis*

Se obtuvo los aislados proteicos hidrosolubles de acuerdo al método descrito en el punto 3. 2. 3.

En esta investigación, el rendimiento del proceso de extracción y precipitación isoelectrica fue de 28 %. Cabe aclarar que el rendimiento se ha calculado en base a la harina deslupinizada y desgrasada de tarwi que ingresa a la extracción alcalina y la cantidad del aislado proteico obtenido al final del proceso.

En la figura 10 se muestran los perfiles electroforéticos de los aislados proteicos a diferentes concentraciones de proteínas. En las líneas del 1 al 4 se observan 7 bandas proteicas.



**Figura 10.** Separación de las proteínas de tarwi por PAGE desnaturalizante. Línea (concentración en  $\mu\text{g}$ ). 1, 8,2; 2, 16,3; 3, 24,5; 4, 32,6.

#### 4. 4 Identificación de cepas de *Bacillus sp.* con mayor actividad proteolítica

De las 15 cepas del género *Bacillus sp.* evaluados se encontró que *Bacillus sp.* TJF41 presentó halos de mayor actividad (14 mm).



**Figura 11.** Halo de hidrólisis de la cepa TJF41, *Bacillus sp.*

#### 4. 5 Producción de proteasas de *Bacillus sp.*

Se utilizó condiciones óptimas de reacción y el uso del medio Horicoshi a pH 9 utilizados para la producción de las proteasas de *Bacillus sp.* TJF4. El sobrenadante (extracto crudo) presentó una actividad enzimática de 0,6 U a pH 8, 50°C y 60 min. Por el contrario, para la enzima alcalasa la actividad fue de 1,06 U en las mismas condiciones de reacción.

#### 4. 6 Hidrólisis enzimática de las proteínas hidrosolubles de *Lupinus mutabilis*

Las concentraciones de los péptidos solubles de las proteínas de tarwi hidrolizadas con alcalasa y crudo enzimático se muestran en la tabla 14. Se observa que las proteínas hidrolizadas con alcalasa presentan mayor concentración de péptidos solubles en comparación de los hidrolizados con crudo enzimático a diferentes tiempos de reacción. Asimismo, se visualiza que la mayor concentración de hidrolizado proteico, se observa a 90 min de reacción, siendo los valores 1383,17 y 663,55  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para los hidrolizados con alcalasa y crudo enzimático respectivamente.

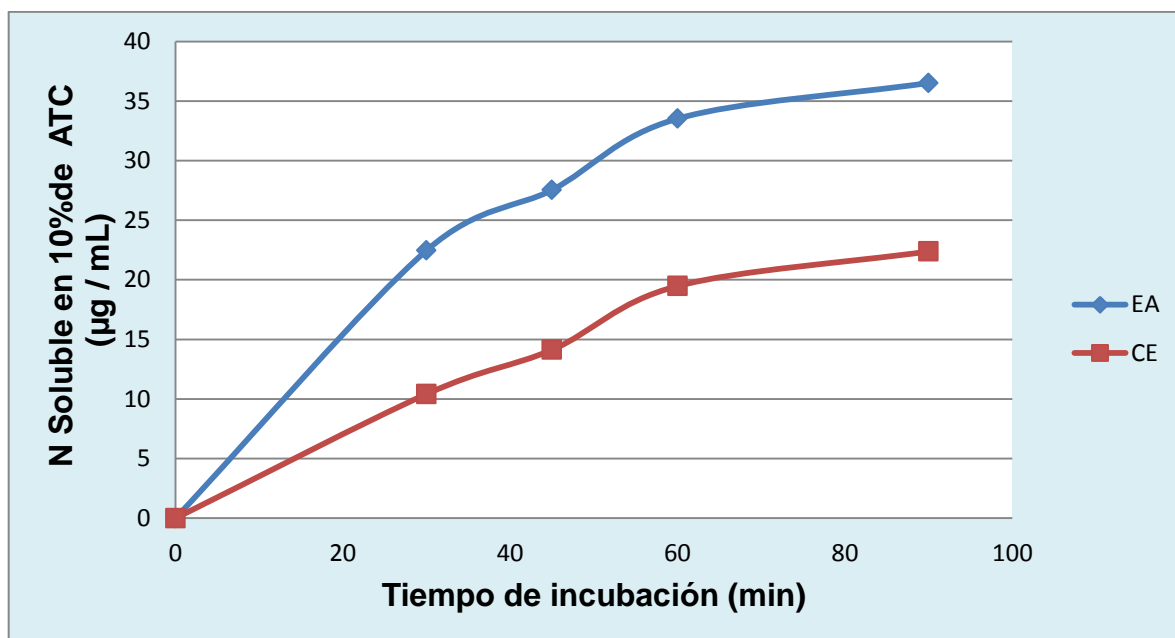
**Tabla 14.** Hidrolizados proteicos obtenidos de tarwi por efecto de las proteasas

Hidrolizados*	Concentración del hidrolizado proteico ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
H30EA	710.28
H60EA	1196.26
H90EA	1383.17
H30CE	102.80
H60CE	467.28
H90CE	663.55

\*EA, alcalasa; CE, crudo enzimático.

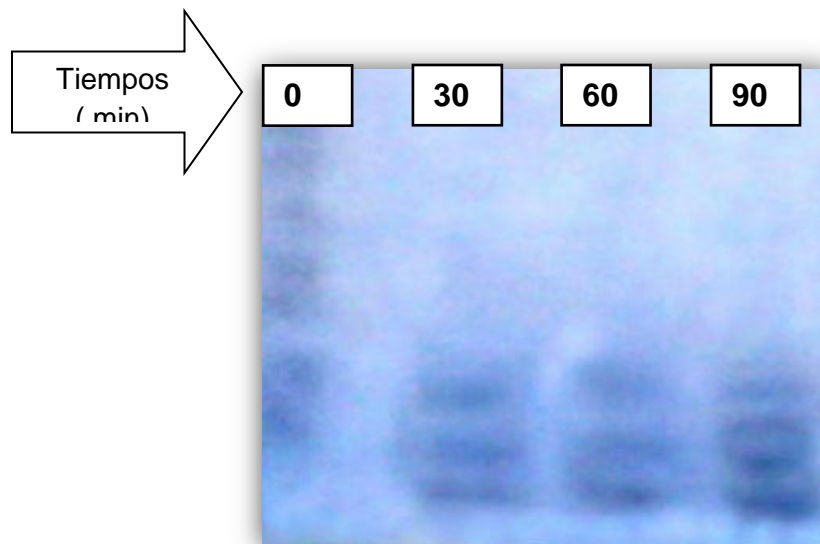


La figura 12 muestra la hidrólisis enzimática de las proteínas hidrolizadas en los diferentes tiempos de reacción. Se puede observar que las proteínas hidrolizadas con alcalasa tienen mayor grado de hidrólisis en comparación a los hidrolizados con crudo enzimático.



**Figura 12.** Hidrólisis enzimática de las proteínas de tarwi con alcalasa (EA) y crudo enzimático (CE).

La figura 13 muestra la separación de los péptidos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de las proteínas de tarwi hidrolizadas con alcalasa. No se evidenció bandas para las proteínas hidrolizadas con crudo enzimático. La línea 1 muestra 7 bandas para la proteína de tarwi no hidrolizada, sin embargo, cuando se hidroliza con alcalasa, exhibe 3 bandas de menor tamaño en todos los tiempos de reacción indicando que el tiempo óptimo de reacción fue 15 min, dado que en los tres tiempos utilizados tienen la misma concentración.



**Figura 13.** Electroforesis (SDS- PAGE) de proteína *Lupinus mutabilis* hidrolizadas con alcalasa a diferentes tiempos de reacción.

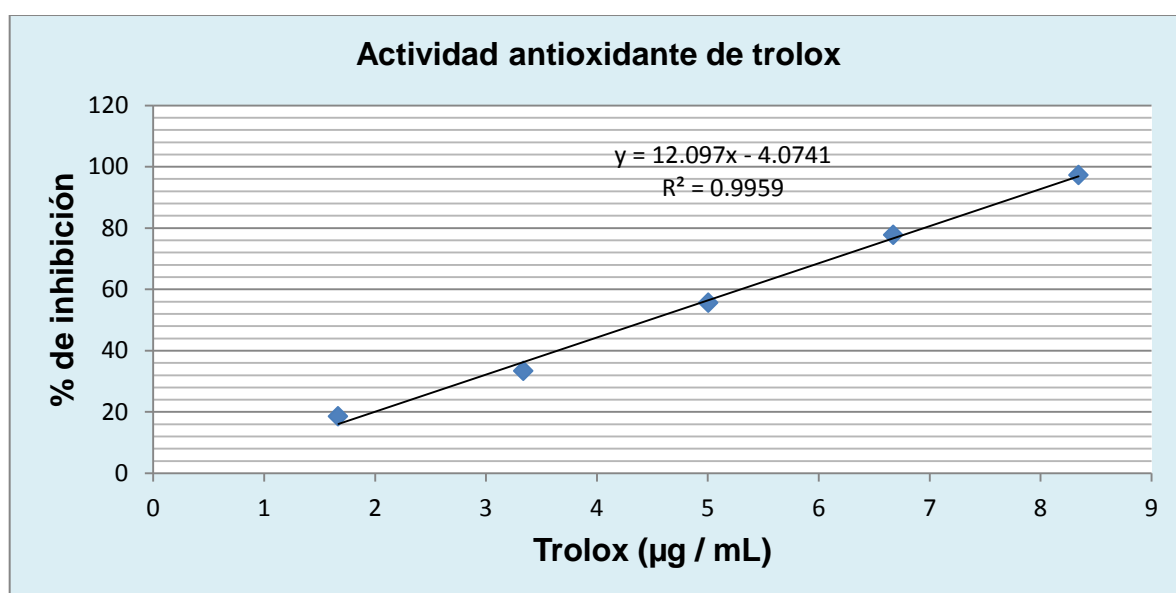
#### **4. 7 Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos obtenidos de las semillas de *L. mutabilis***

En la tabla 15 se muestra que el máximo porcentaje de inhibición (97,22 %) del trolox se alcanza a una concentración de 8,3  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . A la misma concentración los H90EA y H90CE obtienen porcentajes de inhibición de 10,09 y 5,58 % respectivamente (Tabla 16 y 17). En las tres tablas descritas anteriormente, se puede evidenciar que el porcentaje de inhibición es mayor para las proteínas hidrolizadas con la enzima alcalasa que con el crudo enzimático de *Bacillus sp.*, asimismo, el porcentaje aumenta cuanto mayor es la concentración y el tiempo de reacción enzimática de las muestras (Figura 15 y 16). Así, para H30EA el

porcentaje de inhibición es 2,01 % significativamente menor comparado a H60EA, H90EA (Anexo 8).

**Tabla 15.** Porcentaje de inhibición de Trolox mediante la reacción con DPPH.

Trolox ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Inhibición (%)
1,6	18,51
3,3	33,33
5,0	55,55
6,6	77,77
8,3	97,22
IC 50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	4,47

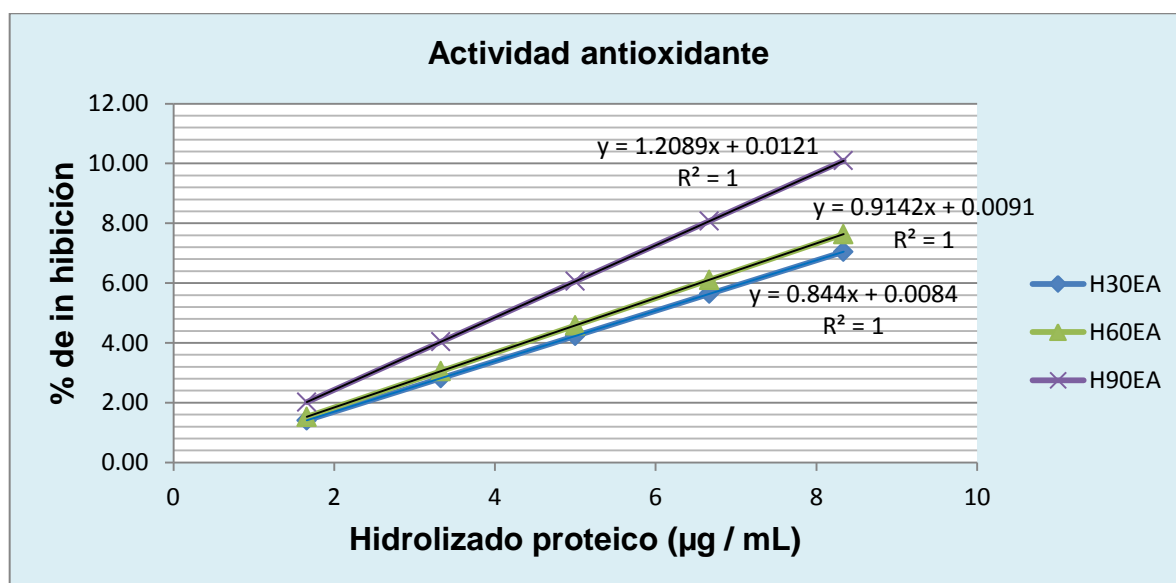


**Figura 14.** Curva patrón del Trolox expresado en  $\mu\text{g} / \text{mL}$  versus % inhibición.

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibición de hidrolizados proteicos de tarwi mediante la reacción con DPPH.

Hidrolizado proteico ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Inhibición (%)		
	H30EA	H60EA	H90EA
1,6	1,40	1,52	2,01
3,3	2,81	3,05	4,03
5,0	4,22	4,58	6,05
6,6	5,63	6,10	8,07
8,3	7,04	7,63	10,09
IC 50 ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	58,40	54,69	41,38

\*EA, alcalasa

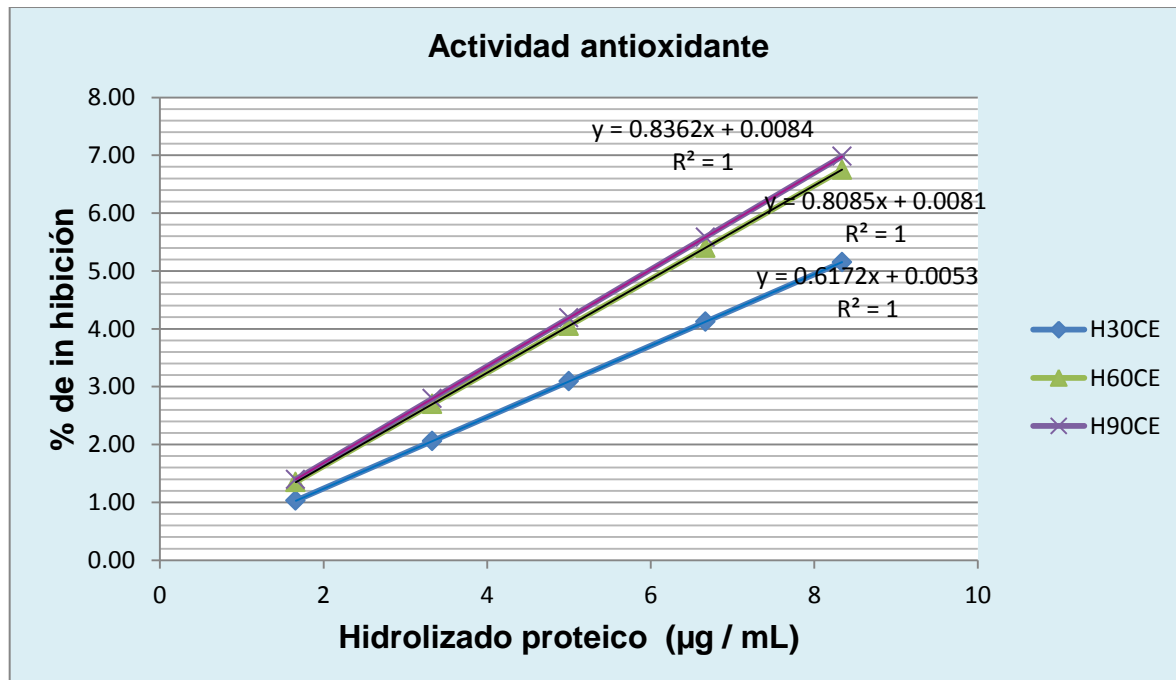


**Figura 15.** Relación de hidrolizados proteicos de tarwi con alcalasa versus % inhibición.

**Tabla 17.** Porcentaje de inhibición de hidrolizados proteicos de tarwi con crudo enzimático mediante la reacción con DPPH.

Con. de Muestra ( µg / mL)	Inhibición (%)		
	H30CE	H60CE	H90CE
1,6	1,03	1,35	1,39
3,3	2,06	2,70	2,79
5,0	3,09	4,05	4,18
6,6	4,12	5,40	5,58
8,3	5,15	6,75	6,98
<b>IC 50 (µg / mL)</b>	<b>79,48</b>	<b>61,87</b>	<b>59,80</b>

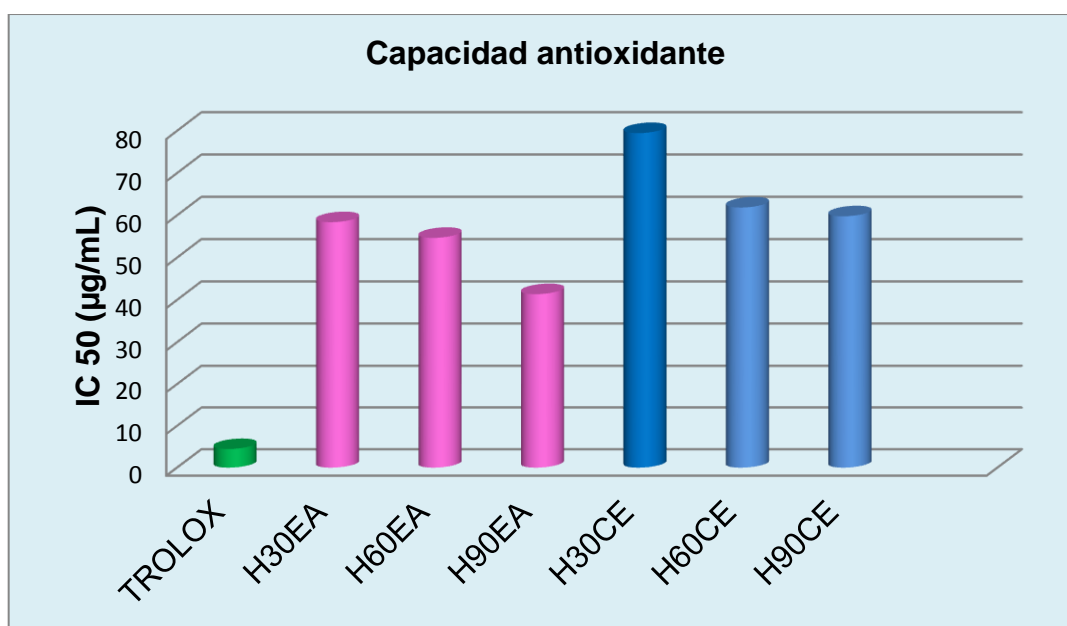
\*CE, crudo enzimático



**Figura 16.** Relación de hidrolizados proteicos de tarwi con extracto enzimático versus % inhibición.

Por otro parte, las menores concentraciones de hidrolizado proteico de tarwi, requeridas para el 50 % de inhibición del radical libre DPPH (IC<sub>50</sub>), fueron para Trolox, H90EA, H90CE a 4,47 µg / mL, 41,38 µg / mL y 59,80 µg / mL, respectivamente (Tabla 15, 16 y 17).

La figura 17 muestra que el CI 50 es menor cuanto mayor es la concentración del hidrolizado proteico de tarwi y mayor su tiempo de hidrólisis enzimática.



**Figura 17.** Comparación de la capacidad antioxidante mediante la IC<sub>50</sub> de los hidrolizados proteicos de tarwi con alcalasa (EA), crudo enzimático (CE) y Trolox.

## 5 DISCUSIÓN

En la obtención de la harina de tarwi, el tamizado causó el 26 % de pérdida de materia prima, esto debido a que el proceso de molienda no fue homogéneo y se produjeron gránulos de diferente tamaño, así, al pasar la harina por el tamiz N° 60 (0,24 mm) hubo mayor retención de gránulos y menor cantidad de harina. También, en el proceso de deslupinizado se pierden proteínas (en especial en la operación del tratamiento térmico y lavado), al igual que su capacidad de renaturalización por lo que no es posible su recuperación mediante la precipitación isoeléctrica.

Según los datos mostrados en la tabla 13 sobre el análisis proximal de la harina de tarwi, el contenido proteico y lípidos de la harina deslupinizada de tarwi es de 46,37 y 31,57 % respectivamente. El análisis muestra que el contenido de proteínas es alto, lo que indica que el proceso de deslupinizado con los parámetros utilizados tuvo repercusión positiva en la riqueza proteica. Asimismo, estos datos se corresponden con los reportados por Mujica y col (97,98). Por otro lado, Ortega y col (100), realizaron el análisis proximal a la harina de tarwi para determinar humedad, grasa y proteínas, siendo estos: 9,63; 13,91 y 44,86 %, respectivamente. Sin embargo, en cuanto al contenido de grasa, los resultados difieren significativamente con los obtenidos en esta investigación posiblemente debido a las condiciones climáticas y manejo agronómico del tarwi, o debido al uso de etanol como solvente extractor de grasa, en vez de usar solventes de menor polaridad como el n-Hexano, entre otros.

En el proceso de extracción y precipitación isoeléctrica las proteínas principalmente obtenidas son  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  conglutinas (119). Asimismo, el rendimiento de obtención del aislado proteico fue 28 %, lo cual es ligeramente bajo en comparación al aislado obtenido por Simbaña y col (120), 55.52 %, en condiciones similares de extracción. Por otra parte, Rodríguez y col (133), encontraron rendimientos 31% a nivel laboratorio y de 28,4 % a nivel planta piloto, estos valores son inferiores a los datos obtenidos en ésta investigación, el cual evidencia que optimizar los parámetros incrementa significativamente los rendimientos. Es posible alcanzar mayores rendimientos, sin embargo se ha utilizado equipos de baja capacidad en la que las pérdidas fueron significativos, esto podría mejorarse utilizando equipos adecuados, evitando de esta manera el número de extracciones.

En la figura 10 las líneas del 1 al 4, correspondientes a los aislados proteicos obtenidos, muestran seis bandas las cuales podrían reflejar las proteínas mayoritarias presentes en los aislados proteicos de *Lupinus mutabilis* como las globulinas (conglutinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\delta$ ) y albuminas (23–25)

Durante los estudios realizados, las condiciones de producción de las proteasas de *Bacillus sp.*, influyen en la actividad enzimática. Por ello, en la sección 4. 5 se describe que la alcalasa (enzima purificada) presentó mayor actividad en comparación al crudo enzimático de *Bacillus sp.* Además, diferentes estudios han



evidenciado ventajas del uso de la alcalasa por su amplia actividad hidrolítica y rangos de sustratos (35).

En la tabla 14, se puede mostrar que las proteínas hidrolizadas de tarwi con alcalasa presentan mayor concentración de péptidos solubles en comparación a las del crudo enzimático. Sarmadi y col (35), han evidenciado que la alcalasa proporciona mayor concentración de péptidos cortos.

Algunas investigaciones, han demostrado que el mayor grado de hidrólisis de proteínas se obtienen con alcalasa, que con otras proteasas (73). Esto se debe, a que la alcalasa es un producto comercial derivado de *B. licheniformis*, que contiene varias proteinasas cada una con diferentes especificidades, lo cual fue confirmado por Doucet y col (81), quienes reportan un patrón electroforético de al menos cuatro proteínas diferentes.

La figura 13, muestra 3 bandas formadas en los tres tiempos de reacción (15, 30, 90 min) de la proteína de tarwi con alcalasa. Resultados semejantes fueron obtenidos de otras leguminosas. Así, Torruco y col (113), reportaron 3 bandas de bajo peso molecular en los rangos de 21,6 a 30,5 kDa después de la hidrólisis de las proteínas de *P. lunatus* con alcalasa a tiempos de reacción de 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min. En contraste, el hidrolizado de las proteínas de *P. vulgaris* presentó 4 bandas de bajo peso molecular en los rangos de 26,5 a 13,0 kDa solo en los tiempos de reacción de 15, 30, 45, 60 y 75 min.

Los radicales relativamente estables de DPPH han sido ampliamente usados para probar la capacidad de componentes para actuar como captadores de radicales libres o donadores de protones y por lo tanto para evaluar la actividad antioxidante (74). Éstos antioxidantes donan hidrógeno a los radicales libres, disminuyen las especies no tóxicas y por tanto la inhibición de la fase de propagación de la oxidación de lípidos. Los resultados en las tablas 16 y 17 muestran que los hidrolizados liberados por alcalasa fueron más activos (mayor porcentaje de inhibición) al decolorar el DPPH en comparación a los hidrolizados liberados por el crudo enzimático. Asimismo, cabe destacar que la mayor actividad de captación de radicales libres los presentó el H90EA con una actividad de 10,09 % a una concentración de 8,3 µg / mL. Sin embargo, éste valor aún es mucho menor a nuestro referente, Trolox, el cual a la misma concentración presenta una actividad antioxidante del 97,22 %. A la vez, Yanhong Li y col (24), obtuvieron mayores porcentajes de inhibición después de analizar hidrolizados de proteínas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), fraccionadas mediante una columna de filtración en gel. Ellos encontraron que a una concentración de muestra de 1 µg / mL la fracción IV y II obtuvieron porcentajes de inhibición de 85,82 a 44,31 %, respectivamente. Por otro lado, diferentes estudios indicaron que la actividad antioxidante depende de las fuentes de proteínas (26,121).

La capacidad antioxidante obtenida en los hidrolizados proteicos de tarwi con alcalasa y crudo enzimático de *Bacillus* sp de acuerdo a lo reportado en las tablas 16 y 17 y figuras 15 y 16, se sustenta con lo reportado por Lampar Szczapa y col

(12) quienes mencionan que la proteína de lupino debido a su composición aminoacídica es una fuente potencial de péptidos antioxidantes.

Respecto a la concentración requerida para el 50 % de inhibición del radical libre DPPH (IC<sub>50</sub>), se observa que el hidrolizado H90EA presenta un valor de IC<sub>50</sub> igual a 41,38 µg / mL más cercano al Trolox (4,47 µg / mL), lo cual demostraría su mayor poder antioxidante en comparación al IC<sub>50</sub> obtenido en los otros hidrolizados. Dado que a menor valor de IC<sub>50</sub> mayor es la capacidad antioxidante.

## 6 CONCLUSIONES

- 1) El contenido de proteínas y lípidos de la harina de tarwi deslupinizadas es 46,37 y 31,57 % respectivamente. En el proceso de obtención de la harina de tarwi y el aislado proteico se obtuvieron 37 y 28 % de rendimiento.
- 2) Los hidrolizados proteicos de tarwi H90EA y H90CE, obtenidos con alcalasa y crudo enzimático de *Bacillus sp*, presentaron mayor concentración de péptidos solubles de 1383,17 y 663,55 µg/ mL, respectivamente a pH 8 y 50 °C.
- 3) Los hidrolizados proteicos H90EA y H90CE presentaron mayor actividad antioxidante de 10,09 y 5,58 %, y un menor valor del CI50 de 41,38 y 59,80 µg / mL, respectivamente.

## 7 RECOMENDACIONES

- Optimizar el sistema de extracción de grasas mediante uso de solventes de menor polaridad y/o sistemas más sofisticados como el de extracción de disolventes en equipos como soxhlet.
- Optimizar los rendimientos de extracción de las proteínas de la harina de tarwi.
- Optimizar las condiciones de producción de las proteasas de *Bacillus sp*, TJF41.
- Separar las fracciones de los hidrolizados proteicos para determinar la fracción responsable de la actividad antioxidante.
- Separar los péptidos de la fracción proteica con actividad antioxidante.
- Determinar la composición aminoacídica de los péptidos obtenidos.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh BP, Vij S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*. Elsevier Inc. 2014; 54:171–179.
2. Vioque J, Millán F. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. 2006;103–107.
3. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18(2):163–169.
4. Cánovas MJ, Rentero ZP, Martínez-Cachá Martínez A, Leal Hernández M, Abellán AJ. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investig en Arterioscler*. 2011;23(5):219–227.
5. Boschini G, Scigliuolo GM, Resta D, Arnoldi A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chem*. Elsevier Ltd. 2014;145:34–40.
6. Carrasco J, Hernández AJ, Jiménez C, Jacinto C, Alaiz M, Girón J, et al. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chem*. Elsevier Ltd. 2012;135(3):1789–1795.
7. Magni C, Sessa F, Accardo E, Vanoni M, Morazzoni P, Scarafoni A, et al. Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *J Nutr Biochem*. 2004;15(11):646–650.
8. Wait R, Gianazza E, Brambilla D, Eberini I, Morandi S, Arnoldi A, et al. Analysis of *Lupinus albus* storage proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2005;53(11):4599–4606.
9. Hernández B, Hsieh C-C, De Lumen BO. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*. 2009;30(2):426–430.
10. Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *BioFactors*. 2000;12(4):143–146.

11. Millán MDC, Yust MDM, Alcaide JM, Millán F, Pedroche J. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem.* 2014;151:141–147.
12. Lampart E, Korczak J, Nogala M, Zawirska R. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chem.* 2003;83(2):279–285.
13. Gross R, von Baer E, Koch F, Marquard R, Trugo L, Wink M. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low-alkaloid content. *J Food Compos Anal.* 1988;1(4):353–361.
14. Girgih AT, He R, Malomo S, Offengenden M, Wu J, Aluko RE. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *J Funct Foods.* Elsevier Ltd; 2014;6(204):384–394.
15. Pedroche J, Yust MM, Girn-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *J Sci Food Agric.* 2002;82(9):960–965.
16. Sirtori E, Resta D, Brambilla F, Zacherl C, Arnoldi A. The effects of various processing conditions on a protein isolate from *Lupinus angustifolius*. *Food Chem.* Elsevier Ltd. 2010;120(2):496–504.
17. Jakubczyk A, Karaś M, Baraniak B, Pietrzak M. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* 2013;141(4):3774–3780.
18. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des.* 2003;9(16):1297–1308.
19. Hernández B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem.* American Chemical Society. 2004;52(6):1504–1510.
20. Chel-Guerrero L. Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Protein Hydrolysates with ACE-I Inhibitory Activity. *Food Nutr Sci.* Scientific Research Publishing. 2012; 03 (04): 511–521.
21. Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/ONU Expert Consultation: Rome. 2004.

22. Akilloğlu HG, Karakaya S. Effects of heat treatment and in vitro digestion on the Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *Eur Food Res Technol.* 2009;229(6):915–921.
23. Valdez A, Fuentes CI, Germán LJ, Gutiérrez R, Medina S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Sci Technol.* Elsevier Ltd. 2012;46(1):91–96.
24. Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.* 2008;106(2):444–450.
25. Durak A, Baraniak B, Jakubczyk A, Świeca M. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chem.* 2013;141(3):2177–2183.
26. Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F. Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean .beta.-Conglycinin. *J Agric Food Chem.* American Chemical Society. 1995;43(3):574–578.
27. Lapsongphon N, Yongsawatdigul J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. *Food Chem.* Elsevier Ltd. 2013;141(2):992–999.
28. Kou X, Gao J, Xue Z, Zhang Z, Wang H, Wang X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;50(2):591–598.
29. Iwaniak A, Dziuba J. BIOPEP-PBIL Tool for the Analysis of the Structure of Biologically Active Motifs Derived from Food Proteins. 2011;49(1):118–127.
30. Tsuruki T, Takahata K, Yoshikawa M. Anti-alopecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimulating peptide derived from soy beta-conglycinin. *Peptides.* 2005;26(5):707–711.
31. Herrera OJ. Detección de Péptidos de Lupino Similares a Lunasina de Soya. Instituto Politécnico Nacional. 2009. p. 65–67.
32. Duranti M, Consonni A, Magni C, Sessa F, Scarafoni A. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends Food Sci Technol.* 2008;19(12):624–633.



33. Mellander O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc Med Ups.* 1950;55(6):247–255.
34. Fields K, Falla TJ, Rodan K, Bush L. Bioactive peptides: signaling the future. *J Cosmet Dermatol.* 2009;8(1):8–13.
35. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides.* Elsevier Inc. 2010;31(10):1949–1956.
36. Ondetti MA, Cushman DW. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev Biochem. Annual Reviews.* 1982;51:283–308.
37. Demejia E, Delumen B. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. *Sex Reprod Menopause.* 2006;4(2):91–95.
38. Hernández-Ledesma B, Miralles B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J Sci Food Agric.* 2005;85(6):1041–1048.
39. Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J Nutr.* 2005;94(5):731–737.
40. Mallikarjun Gouda KG, Gowda LR, Rao AGA, Prakash V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *J Agric Food Chem.* 2006;54(13):4568–4573.
41. Silva S V, Pihlanto A, Malcata FX. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J Dairy Sci.* 2006;89(9):3336–3344.
42. Hernández-Ledesma B, Martín-Alvarez PJ, Pueyo E. Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type. *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4175–4179.
43. Wanasundara JP and Marambe PW. Seed Storage Proteins as Sources of Bioactive Peptides. 2nd ed. Uruakpa FO., editor. Canada: Nova Science Publishers ,Inc; 2012.
44. Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int.* 2004;37(2):123–131.

45. Penta EA, Xiong YL. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J Food Sci.* 2002;67(8):2952–2956.
46. Saito K, Jin D-H, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *J Agric Food Chem.* 2003;51(12):3668–3674.
47. Chen G, Zhao L, Zhao L, Cong T, Bao S. In vitro study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *J Sci Food Agric.* 2007;87(2):357–3562.
48. Li X, Han L, Chen L. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *J Sci Food Agric.* 2008;88(9):1660–1666.
49. Chen H, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem.* 1998;46(1):49–53.
50. Dávalos A, Gómez C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem. American Chemical Society.* 2004;52(1):48–54.
51. Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2001;49(6):2992–2997.
52. Gobbetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42(3):223–2239.
53. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive Peptides. *J AOAC Int. AOAC International.* 2008;91:914–931.
54. Kim SG, Kim ST, Wang Y, Kim S-K, Lee CH, Kim K-K, et al. Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiol Plant.* 2010;138(1):1–9.
55. Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int.* 2003:949–957.
56. Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility

- and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. J Nutr. 1999;129(9):1725–1730.
57. Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. Biochem Biophys Res Commun. 2001;281(1):11–17.
  58. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F, Gatti E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. J Nutr. 1995;125 Suppl 3: S598–S605.
  59. De Mejía DL. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. Am Soc Reprod Med. 2006;2:91–5.
  60. Rutherfurd KJ, Moughan PJ. Bioactive peptides derived from food. J AOAC Int. 2005;88(3):955–966.
  61. Martínez AO, Martínez E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Nutr Hosp. Aula Médica Ediciones. 2006;21:1–14.
  62. Kitts DD, Yuan YV, Nagasawa T, Moriyama Y. Effect of casein, casein phosphopeptides and calcium intake on ileal <sup>45</sup>Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Br J Nutr. 1992 ;68(3):765–781.
  63. Udenigwe CC, Aluko RE. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. Int J Mol Sci. 2011;12(5):3148–3161.
  64. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. Biochim Biophys Acta. 1999;1462(1-2):71–87.
  65. Cudic M, Otvos L. Intracellular targets of antibacterial peptides. Curr Drug Targets. 2002;3(2):101–106.
  66. Miyashita M, Akamatsu M, Ueno H, Nakagawa Y, Nishimura K, Hayashi Y, et al. Structure-activity relationships of RGD mimetics as fibrinogen-receptor antagonists. Biosci Biotechnol Biochem. 1999;63(10):1684–1690.
  67. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. Cancer Res. 2001;61(20):7473–7478.
  68. Marambe P. Seed Proteins. Nova Science Publisher, Inc . 2011:61-65

69. Barca AM, Ruiz RA, Jara ME. Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Soy Protein to Improve its Amino Acid Composition and Functional Properties. *J Food Sci.* 2000;65(2):246–253.
70. Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *J Agric Food Chem.* 2005;53(19):7600–7608.
71. Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 2011;124(4):1354–1362.
72. Ahn C-B, Jeon Y-J, Kim Y-T, Je J-Y. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochem.* Elsevier Ltd. 2012;47(12):2240–2245.
73. Ko S-C, Lee J-K, Byun H-G, Lee S-C, Jeon Y-J. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochem.* 2012;47(1):34–40.
74. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem.* 2010;118(2):403–410.
75. Agyei D, Danquah MK. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol Adv.* Elsevier Inc. 2011;29(3):272–277.
76. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11(7):254–262.
77. Najafian L, Babji AS. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *J Funct Foods.* Elsevier Ltd. 2014;9:280–289.
78. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. 2008;42(2):227–236.
79. Rao MB, Tanksale a M, Ghatge MS, Deshpande V V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):597–635.

80. Prieto CA. Diseño y Optimización de un Reactor de Membrana Discontinuo para la Hidrólisis Enzimática de Proteínas [tesis doctoral]. Universidad de Granada, Departamento de Ingeniería Química; 2007.
81. Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food Chem.* 2003;51(21):6300–6308.
82. Guerrero L. Biopéptidos alimenticios: nuevos promotores de la salud. *Rev Salud Pública y Nutr.* 2008;9 (2):1–8.
83. Lqari H, Vioque J, Pedroche J, Millán F, Milla F. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 2002;76(3):349–3456.
84. Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia.* 2006;77(2):67–82.
85. Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr.* Cambridge University Press 2012;108 Suppl 2:S183–S211.
86. Young V, Pellett P. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(5):1203–1212.
87. Day L. Proteins from land plants: Potential resources for human nutrition and food security. *Trends Food Sci Technol.* Elsevier Ltd. 2013;32(1):25–42.
88. Murray DR. A storage role for albumins in pea cotyledons. *Plant, Cell Environ.* 1979;2(3):221–226.
89. Scarafoni A, Magni C, Duranti M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. *Trends Food Sci Technol.* 2007;18(9):454–463.
90. *The Vegetable Proteins* by Thomas B. Osborne. Review by: Ernest D. Clark. 1910. pp. 250-252. Published by: Torrey Botanical Society.
91. Mazhar H, Quayle R, Fido RJ, Keith Stobart A, Napier JA, Shewry PR. Synthesis of storage reserves in developing seeds of sunflower. *Phytochemistry.* 1998;48(3):429–32.

92. Danielsson CE. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. *Biochem J.* 1949; 44(4):387-400.
93. Moreno J, Altabella T, Chrispeels MJ. Characterization of  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor, a Lectin-Like Protein in the Seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 1990;92(3):703–709.
94. Duranti M, Gius C. Legume seeds: protein content and nutritional value. *F Crop Res.* 1997;53(1-3):31–45.
95. Mario Vinicio NP. "Extracción, Refinación, y Caracterización Físico - Química y Nutracéutica del Aceite de Chocho (*Lupinus mutabilis* sweet)" [tesis]. Rubamba, Ecuador: Escuela Superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2010.
96. Palacios A, Demetrio M, Espinoza LH. Obtención del alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis* (tarwi) [tesis]. Junín-Perú: Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de Ingeniería Química; 2004.
97. Jacobsen S, Mujica A. El tarwi ( *Lupinus mutabilis* Sweet .) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés. 2006;458–482.
98. Blanner L, Flengmark P, Gylling M, Iteno K. Lupin seed ( *Lupinus albus* and *Lupinus luteus* ) as a protein source for fermentation use. 2003;18:199–211.
99. Peralta, E., N. Mazón, Á. Murillo, M. Rivera, D. Rodríguez, L. Lomas CM. Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Tercera ed. Quito, Ecuador: Publicación Miscelánea No. 69. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos; 2012.
100. Ortega DE, Rodríguez A, David A, Zamora Á. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica.* Universidad Nacional de Colombia. 2010;59(1):111–118.
101. Güemes N, Arciniega RO, Dávila OG. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate, and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *LWT - Food Sci Technol.* 2004;37(3):283–290.
102. Mori CP. Eliminación de alcaloides en el tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante lavado con agua a diferentes pH. *Rev Ciencias Biológicas Univ Católica St María.* 2008;6:48.
103. Baldeón PE. Procesamiento del Chocho (*Lupinus Mutabilis* Sweet) para la obtención de leche y yogurt como alimentos alternativos de consumo humano. Universidad de Guayaquil. 2012. p. 45–48.

104. Graszekiewicz A, Żelazko M, Trziszka T, Polanowski A. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. 2007;57(4):195–199.
105. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(2):248–254.
106. Sitohy M, Osman A. Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Food Chem. Elsevier Ltd. 2010;120(1):66–73.
107. Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. J Taibah Univ Sci. 2014:6–11.
108. Narai-Kanayama A, Shikata Y, Hosono M, Aso K. High level production of bioactive di- and tri-tyrosine peptides by protease-catalyzed reactions. J Biotechnol. Elsevier B.V. 2010;150(3):343–347.
109. Deng A, Wu J, Zhang Y, Zhang G, Wen T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. Bioresour Technol [Internet]. Elsevier Ltd. 2010;101(18):7111–7117.
110. Krishnaveni K, Mukesh DJ, Balakumaran MD, Ramesh S. Production and optimization of extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent. 2012;4(1):98–109.
111. Genckal H, Tari C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme Microb Technol. 2006;39(4):703–710.
112. Dryáková A, Pihlanto A, Marnila P, Čurda L, Korhonen HJT. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. Eur Food Res Technol. 2010;230(6):865–874.
113. Torruco J, Chel L, Martínez A, Dávila G, Betancur-Ancona D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. LWT - Food Sci Technol. 2009;42(10):1597–1604.
114. Cian RE, Martínez AO, Drago SR. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. Food Res Int. Elsevier Ltd. 2012;49(1):364–372.
115. Oseguera ME, De Mejia EG, Dia VP, Amaya-Llano SL. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced

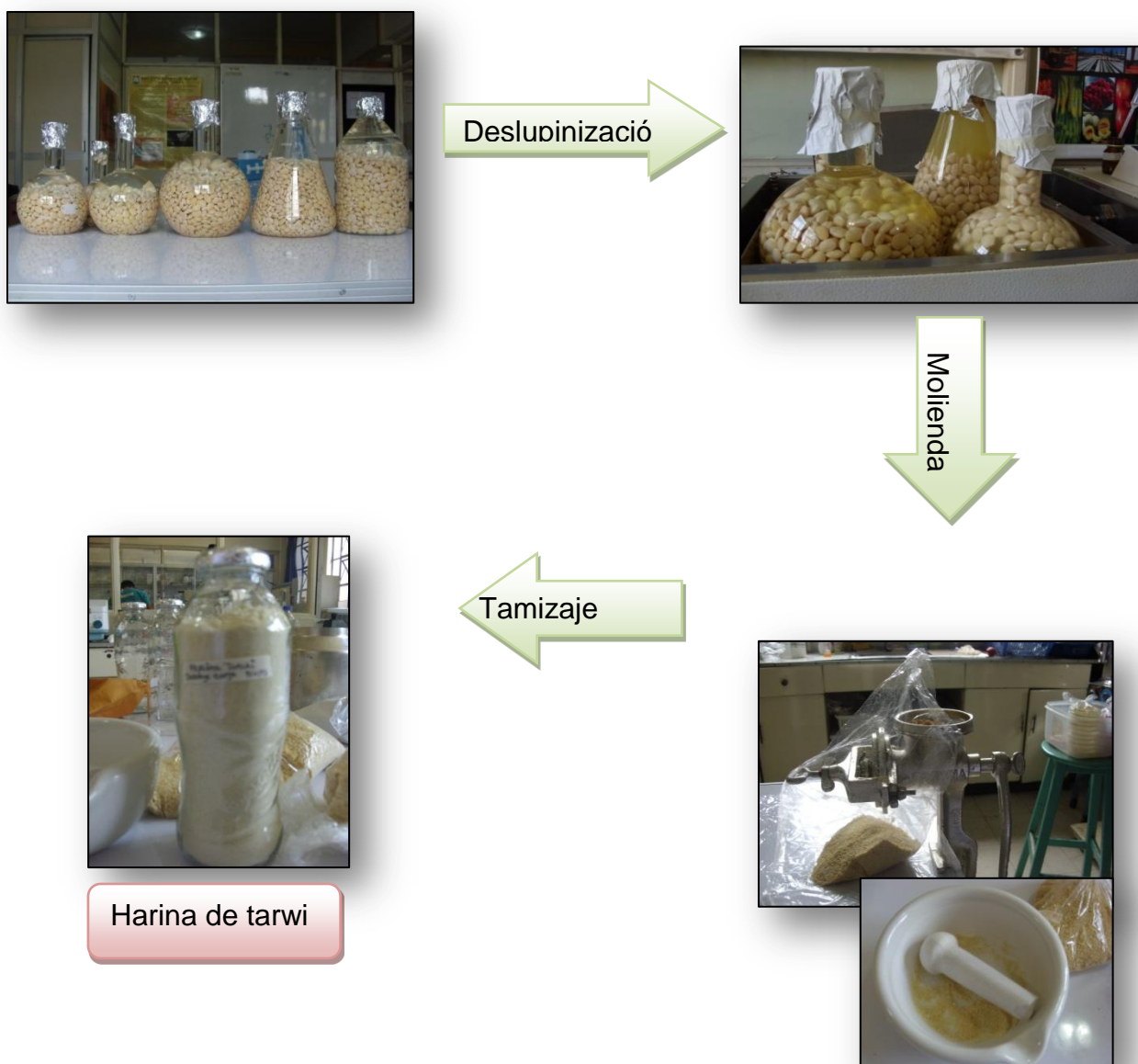
- macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. Food Chem. Elsevier Ltd. 2011;127(3):1175–85.
116. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J Biol Chem. 1951;193:265–75.
117. Kim SY, Park PSW, Rhee KC. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. J Agric Food Chem. American Chemical Society. 1990;38(3):651–6.
118. Di Bernardini R, Harnedy P, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Mullen AM, et al. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chem. Elsevier Ltd. 2011;124(4):1296–307.
119. Sironi E, Sessa F, Duranti M. A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. Eur Food Res Technol. 2005;221(2):145–50.
120. Simbaña CC. Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante [tesis]. Quito: Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria; 2011.
121. Jeon Y-J, Byun H-G, Kim S-K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Process Biochem. 1999;35(5):471–8.



## 9 ANEXOS

### Anexo 1

#### Proceso de obtención de la harina de tarwi



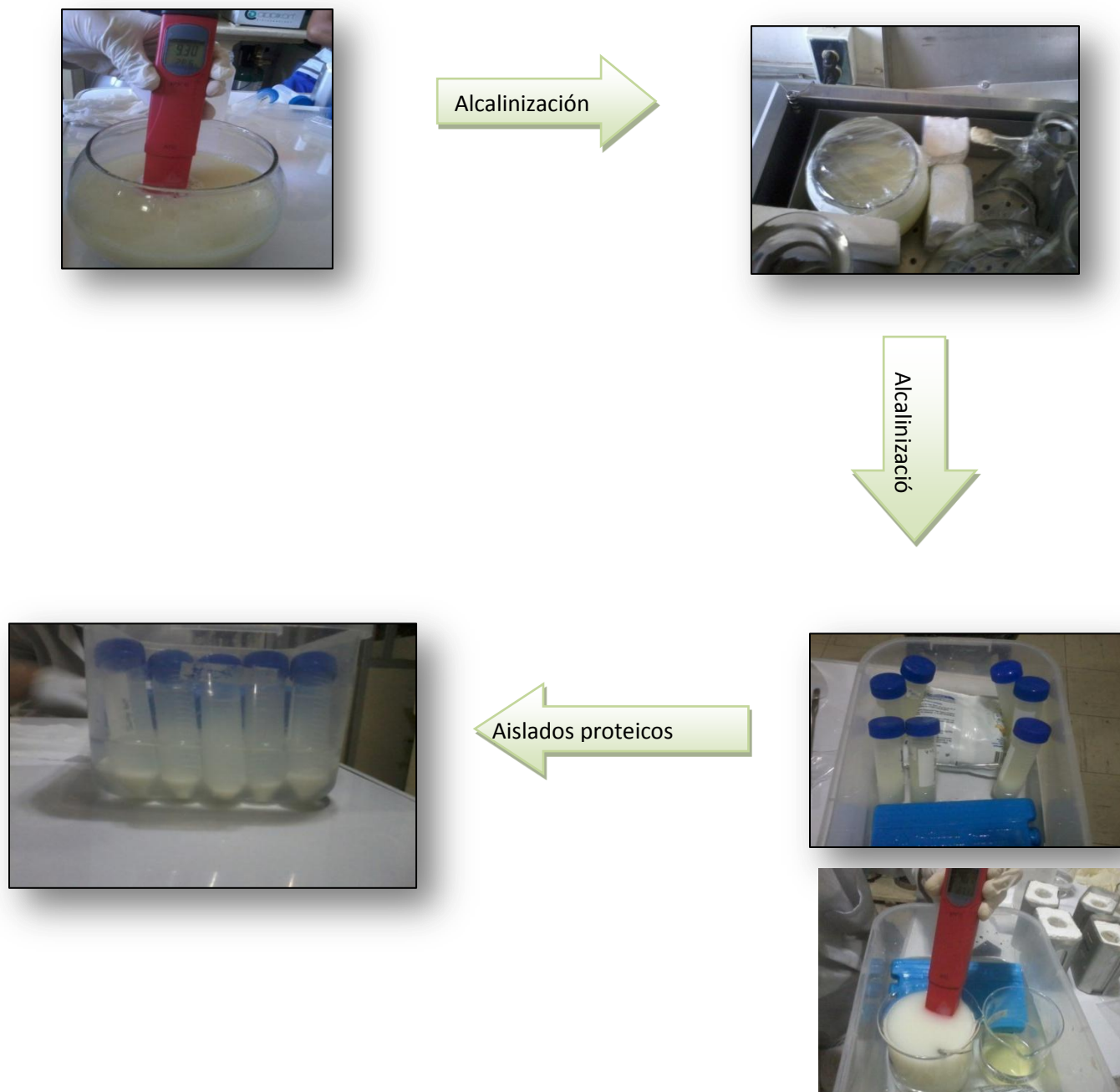
## Anexo 2

Muestras de harina de tarwi secadas con y sin adición de sulfito de sodio al 0.01% (p/p).



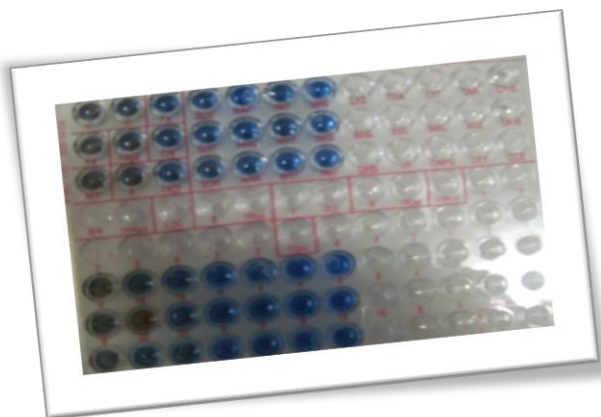
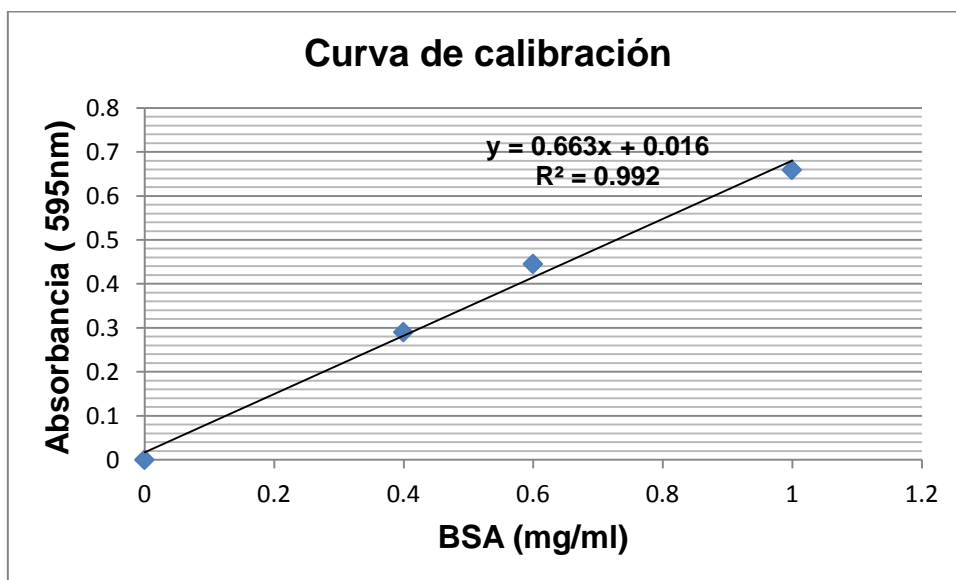
### Anexo 3

#### Proceso de obtención del aislado proteico de tarwi



## Anexo 4

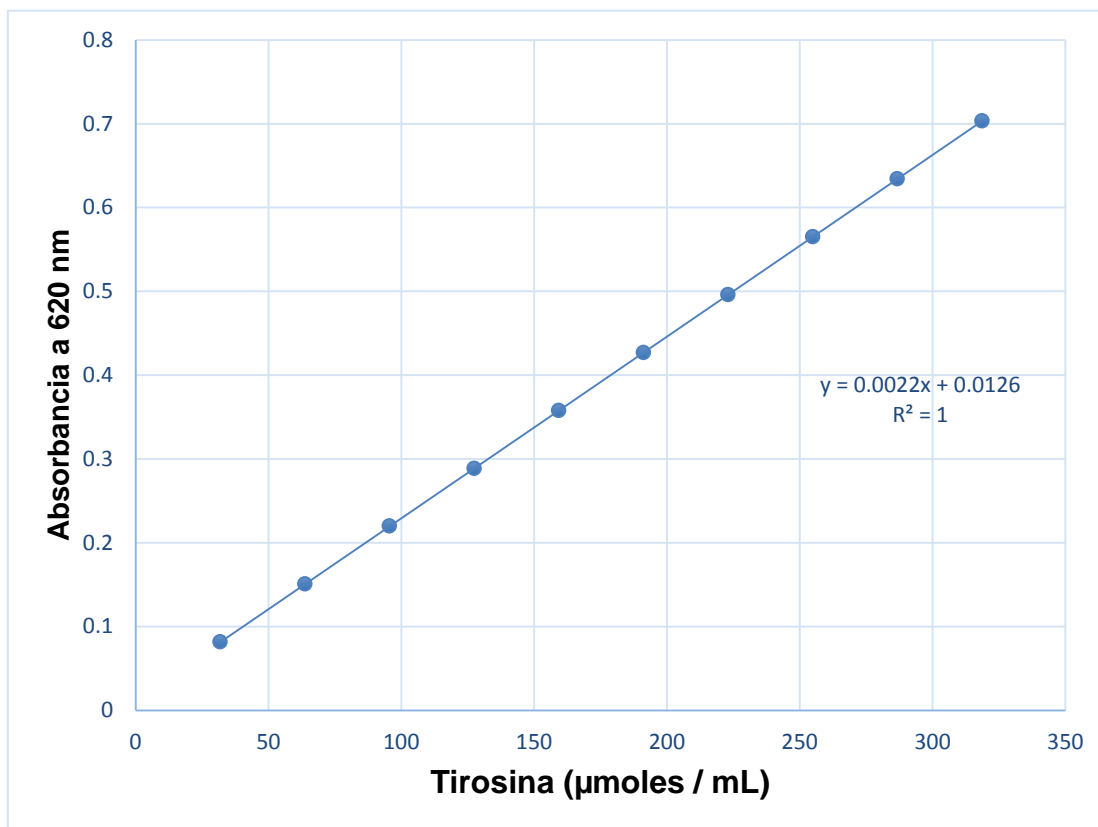
### Curva de calibración de BSA mg/mL mediante técnica de determinación en Microplaca de Bradford



**Microplaca**

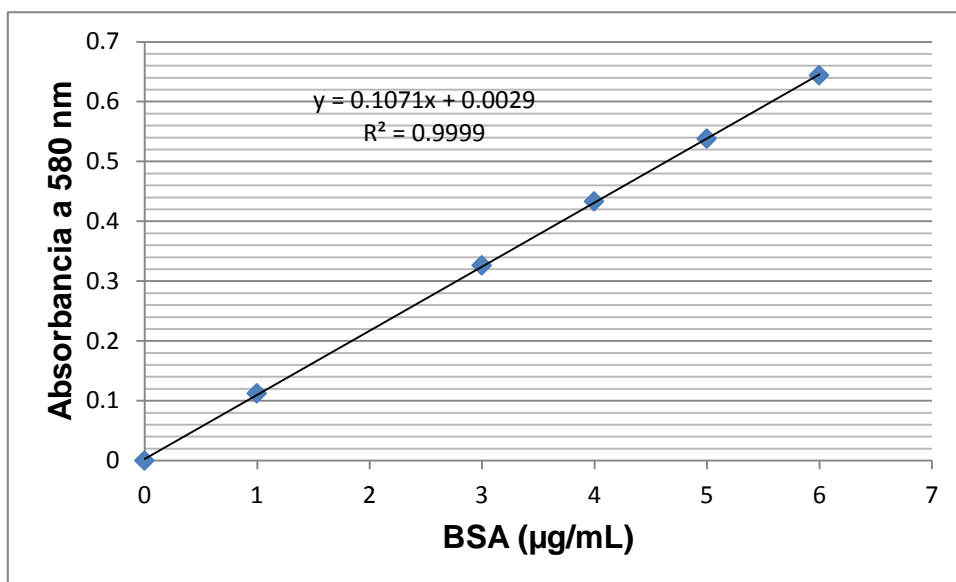
## Anexo 5

### Curva de calibración de tirosina



## Anexo 6

### Curva de calibración de BSA mediante técnica de Lowry en Microplaca



## Anexo 7

### Determinación de actividad antioxidante



Agitación



Los tubos del 1 al 6 contienen muestras de hidrolizados proteicos de tarwi con reacción al DPPH y los tubos 7 y 8 presentan reacción negativa al DPPH.



## Anexo 8

### Análisis de la harina de *Lupinus mutabilis*



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**CENPROFARMA**  
**CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO**



**PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00355-CPF-2014**

ORDEN DE ANÁLISIS	: 002571/2014
SOLICITADO POR	: JACKELINE BORJA
DIRECCIÓN	: Jr. Javier Heraud 183, Luciana, Carabayllo
MUESTRA	: HARINA DE TARWI
Nº DE LOTE	: ---
CANTIDAD	: 01 frasco
FECHA DE RECEPCIÓN	: 07 de Julio del 2014

ANÁLISIS		
PRUEBAS	MÉTODOS	RESULTADOS
APARIENCIA	Organoléptico	Pulverulento.
COLOR	Organoléptico	Crema claro.
OLOR	Organoléptico	Característico.
SABOR	Organoléptico	Característico.
HUMEDAD	AOAC OFFICIAL METHOD 934.01 (1997)	6.98 %
PROTEINAS	AOAC OFFICIAL METHOD 978.04 (1997)	46.37 %
GRASAS	AOAC OFFICIAL METHOD 930.09 (1997)	31.57 %
CENIZAS	AOAC OFFICIAL METHOD 930.05 (1997)	5.14 %
FIBRA	AOAC OFFICIAL METHOD 934.10 (1997)	1.735 %
CARBOHIDRATOS	Por diferencia	8.22 %

Lima, 08 de Agosto del 2014



**Mg. María Elena Salazar Salvatierra**  
Directora del Centro de Control Analítico



FCCA-009 R 1

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL FÓRMICO"

Jc. Puso N° 1002, Jardín Botánico - Lima I - Perú - Tel: (511) 326-4737 Anexo II - Tel: (511) 326-7398 - Ap. Postal 1760 - Lima I  
E-mail: ccainmmsm.edu.pe

<http://www.unmsm.edu.pe/farmacia>